

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA

(Creada por Ley N° 25265)



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA**

TESIS

“Aislamiento de protoplastos de *Solanum tuberosum* (variedad Unica)”

LINEA DE INVESTIGACION

MEJORAMIENTO GENETICO Y BIOTECNOLOGIA

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRONOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

VLADIMIR MARIN GUERRA SANDOVAL

ACOBAMBA – HUANCABELICA

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA
(Creada por ley N° 25265)
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMIA



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En la Ciudad Universitaria "Común Era"; auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, a los 19 días del mes de diciembre del año 2018, a hora 9:30 a.m., se reunieron; el Jurado Calificador, conformado de la siguiente manera:

PRESIDENTE : Mg. Marino, BAUTISTA VARGAS.
SECRETARIO : Ing. Santiago Oscar, PUENTE SEGURA.
VOCAL : M. Sc. Julián Leonardo, MANTARI MALLQUI.
ACCESITARIO : M. Sc. Rolando PORTA CHUPURGO.

Designados con resolución N° 161-2018-D-FCA-UNH; del proyecto de investigación, titulado: "**Aislamiento de protoplastos de Solanum tuberosum (variedad Unica)**".

Cuyo autor es el graduado:

BACHILLER: Vladimir Marin, GUERRA SANDOVAL.

ASESORADO POR: Ing. Jorge Manuel, MONTALVO OTIVO.

A fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del proyecto de investigación, antes citado.

Finalizando la evaluación; se invitó al público presente y al sustentante abandonar el recinto; y, luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al siguiente resultado:

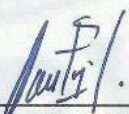
APROBADO ☒ **POR...UNANIMIDAD.....**

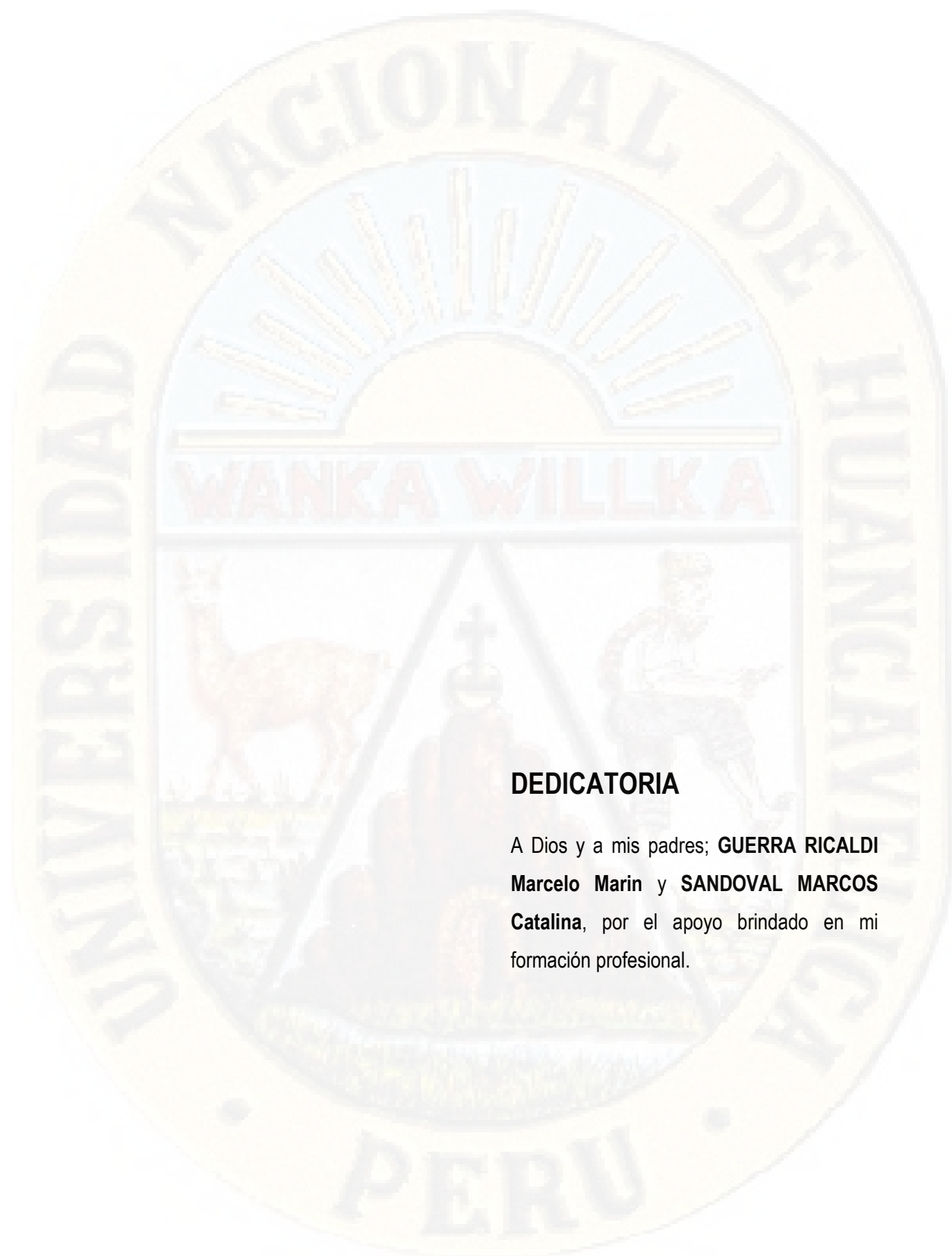
DESAPROBADO ☐

En conformidad a lo actuado firmamos al pie.


Mg. Marino, BAUTISTA VARGAS
Presidente


Ing. Santiago Oscar, PUENTE SEGURA
Secretario


M. Sc. Julián Leonardo, MANTARI MALLQUI
Vocal

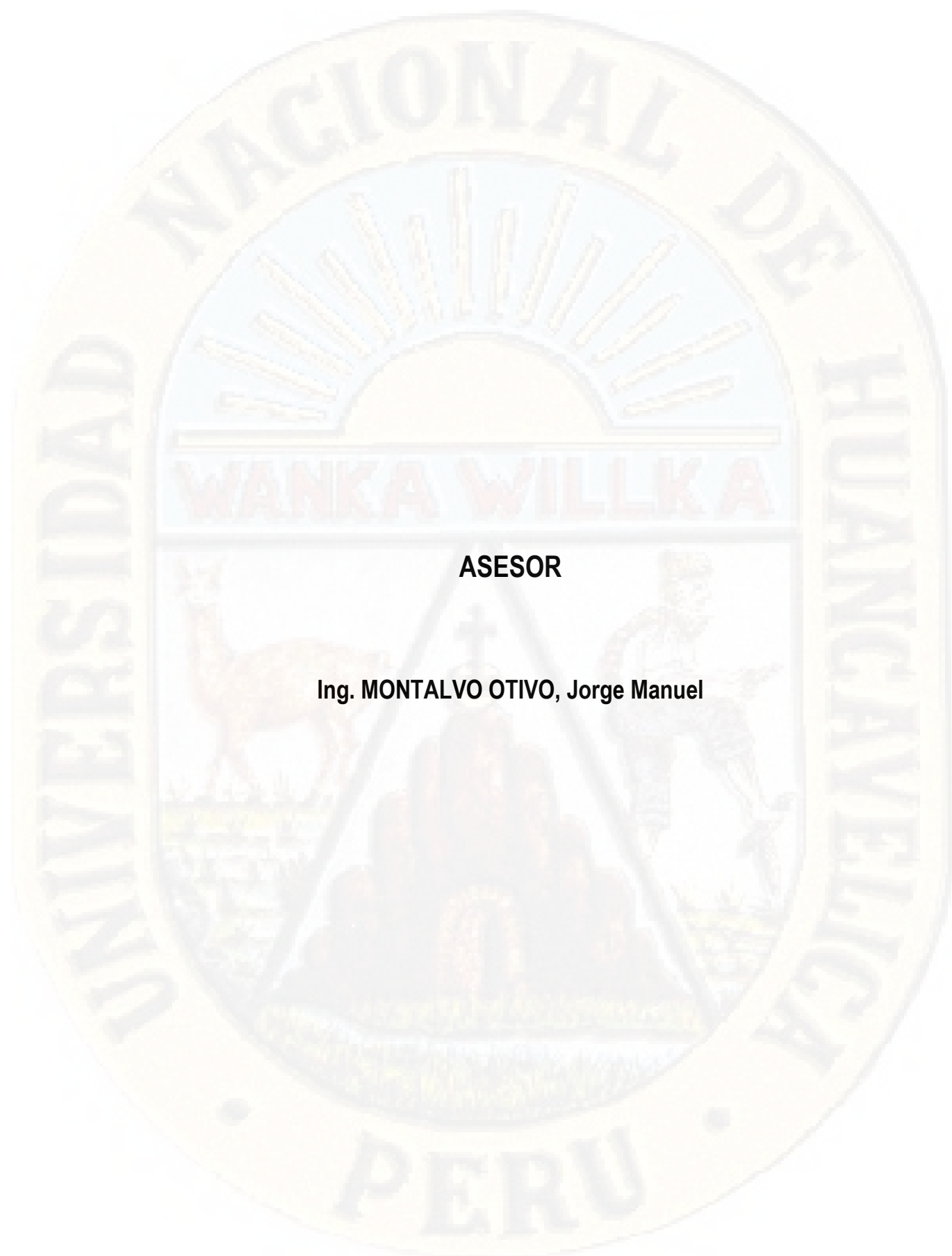


DEDICATORIA

A Dios y a mis padres; **GUERRA RICALDI**
Marcelo Marin y **SANDOVAL MARCOS**
Catalina, por el apoyo brindado en mi
formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar agradezco a la Universidad Nacional de Huancavelica, la beca de movilidad estudiantil que me permitió adquirir conocimientos valiosos para mi formación profesional.
- A la Universidad Pública de Navarra – Pamplona - España por acogerme en sus Laboratorios.
- Al Dr. Luis María, Larraya Reta docente de la UPNA, por compartirme sus valiosos conocimientos para fortalecer la presente investigación.
- A mi asesor por compartirme sus valiosos conocimientos, por ser un gran amigo, y por darme vía libre para hacer la presente investigación, para luego inculcarme como plasmarlo en el papel.
- Al Ing. Rafael Vinci, Torres Maita por el apoyo en la adquisición de las plántulas invitro de *Solanum tuberosum* (variedad Unica).
- A Roger, Yeral, Cary, Rosana por la compañía en el Laboratorio de Biotecnología y Recursos Genéticos, durante el pre ensayo de la investigación y por compartir gratas experiencias.
- A todas las personas que me ha regalado esta universidad, empezando por todos los docentes de la EPA, siguiendo por los administrativos de la FCA y amigos.
- A mi familia, mis padres Marcelo y Catalina por alentarme en todo momento para culminar esta hermosa carrera y a mis hermanos por ser mis hermanos.
- A todos y cada uno de vosotros, mil gracias.



ASESOR

Ing. MONTALVO OTIVO, Jorge Manuel

RESUMEN

Con el fin de obtener un protocolo estandarizado para el aislamiento de *Solanum tuberosum* variedad unica. Sé recuperó protoplastos de hojas de *Solanum tuberosum* variedad unica, en base a cuatro concentraciones enzimáticas: Pectinasa 0,2% + Celulasa 0,2%; Pectinasa 0,3% + Celulasa 0,5%; Pectinasa 0,4% + Celulasa 1%; Pectinasa 1% + Celulasa 1,5%. El mayor número de protoplastos aislados, se logró con Pectinasa (*Rhizopus* sp) 1% + Celulasa (*Aspergillus* sp) 1,5%, obteniéndose 148500 protoplastos x ml⁻¹ en un tiempo de 18 horas; este estudio propone un protocolo estandarizado de aislamiento de protoplastos en *Solanum tuberosum* variedad unica.

Palabras clave: aislamiento; protoplastos; *Solanum* sp; *Solanum tuberosum*; variedad unica.

ABSTRACT

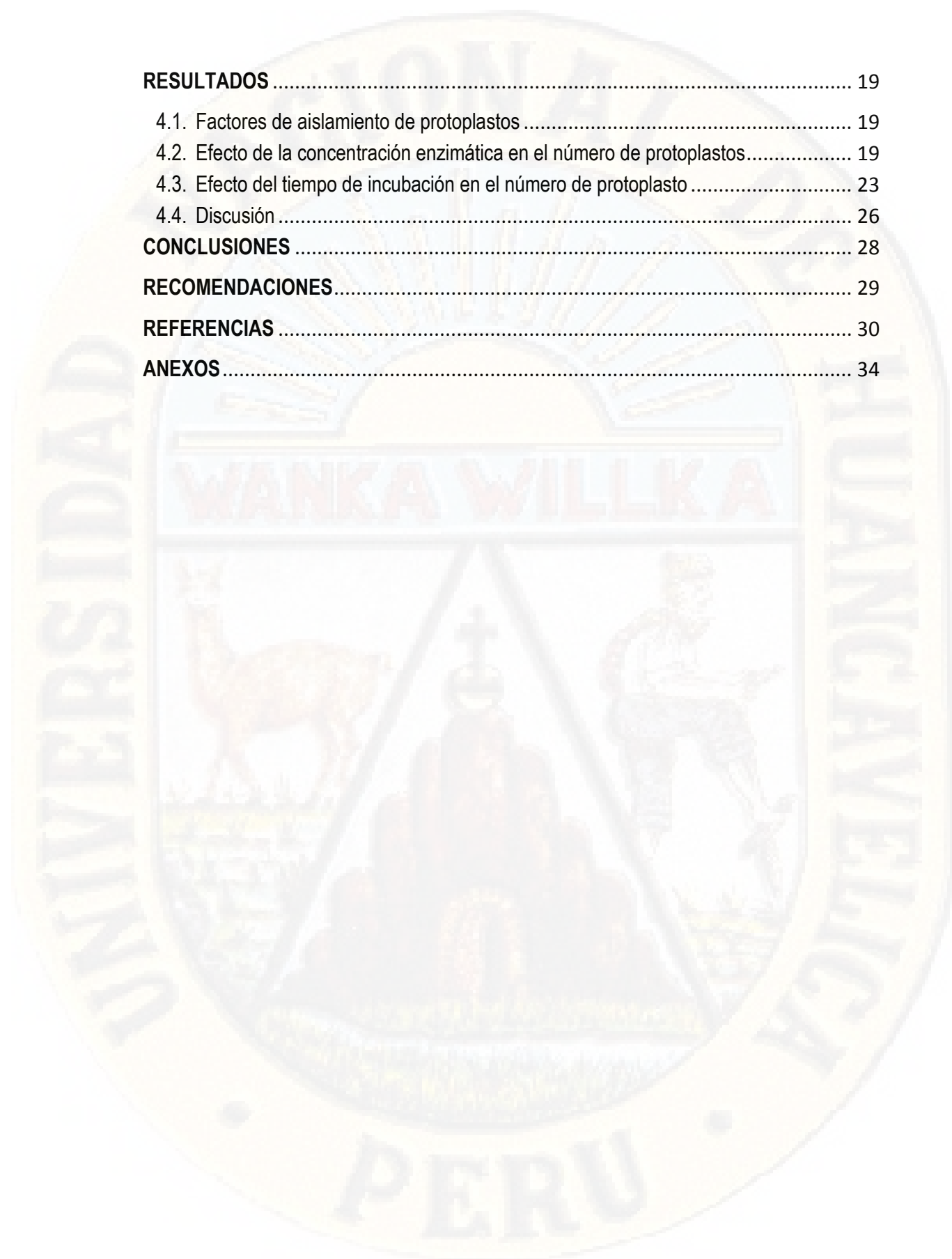
In order to obtain a standardized protocol for the isolation of *Solanum tuberosum* unique variety. Recovered the protoplasts of leaves of *Solanum tuberosum*, unique variety, based on four enzymatic concentrations: Pectinase 0,2% + Cellulase 0,2%; Pectinase 0,3% + Cellulase 0,5%; Pectinase 0,4% + Cellulase 1%; Pectinase 1% + Cellulase 1,5%. The highest number of isolated protoplasts was achieved with Pectinase (*Rhizopus* sp) 1% + Cellulase (*Aspergillus* sp) 1,5%, obtaining 148500 protoplasts x ml⁻¹ in a time of 18 hours; this study proposes a standardized protoplast isolation protocol in *Solanum tuberosum*, unique variety.

Keywords: isolation; protoplasts; *Solanum* sp; *Solanum tuberosum*; unique variety.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRAC	
INTRODUCCION	
CAPITULO I	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1. Descripción del Problema	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Objetivos.....	2
1.4. Justificación	2
CAPITULO II	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Bases Teóricas.....	5
2.2.1. <i>Solanum tuberosum</i> (CIP 392797.22 UNICA)	5
2.2.2. Protoplastos.....	9
2.3. Hipótesis.....	12
2.4. Definición de Términos.....	12
2.5. Definición operativa de variables e indicadores	13
CAPITULO III	14
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	14
3.1. Ámbito de estudio	14
3.2. Tipo de Investigación	14
3.3. Nivel de Investigación	14
3.4. Método de Investigación.....	14
3.4.1 Metodología de Investigación	14
3.5. Diseño de Investigación	15
3.6. Población, Muestra y Muestreo	15
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	16
3.8. Procedimiento de Recolección de Datos	16
3.9. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	18
CAPITULO IV	19

RESULTADOS	19
4.1. Factores de aislamiento de protoplastos	19
4.2. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos.....	19
4.3. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplasto	23
4.4. Discusión	26
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES	29
REFERENCIAS	30
ANEXOS	34



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rasgos de reacción de la variedad única.....	7
Tabla 2. Rendimiento de postcosecha de la variedad unica	8
Tabla 3. Concentraciones de nutrientes en tubérculos de la variedad unica.....	8
Tabla 4. Definición operativa de variables e indicadores	13
Tabla 5. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a la concentración enzimática.....	20
Tabla 6. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto al tiempo de incubación.....	24

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 14 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)	20
Gráfica 2. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 15 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)	21
Gráfica 3. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 16 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)	21
Gráfica 4. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 17 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)	22
Gráfica 5. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 18 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)	22
Gráfica 6. Prueba de Games – Howell para número de protoplastos respecto a concentraciones enzimáticas (pec = pectinasa, cel = celulasa).....	23
Gráfica 7. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,2% mas celulasa al 0,2%.....	24
Gráfica 8. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,3% mas celulasa al 0,5%.....	25
Gráfica 9. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,4% mas celulasa al 1%.....	25
Gráfica 10. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,5% mas celulasa al 1,5 %.....	26

INTRODUCCION

En las próximas dos décadas, se espera que la población mundial crezca en promedio en más de 100 millones de personas al año. Más del 95 por ciento de ese aumento ocurrirá en los países en desarrollo, donde la presión sobre la tierra y el agua ya es intensa. Un desafío clave que enfrenta la comunidad internacional, es garantizar la seguridad alimentaria para las generaciones presentes y futuras, al tiempo que se protege la base de recursos naturales de la que todos dependemos (“¿Por qué papa?,” 2008).

El consumo de papa está expandiéndose fuertemente en los países en desarrollo, que ahora representan más de la mitad de la cosecha mundial y donde la facilidad de cultivo de la papa y el alto contenido de energía lo han convertido en un valioso cultivo comercial para millones de agricultores (“¿Por qué papa?,” 2008). A su vez se prevé que será el alimento del futuro, debido a su incremento en la producción mundial durante los últimos 10 años.

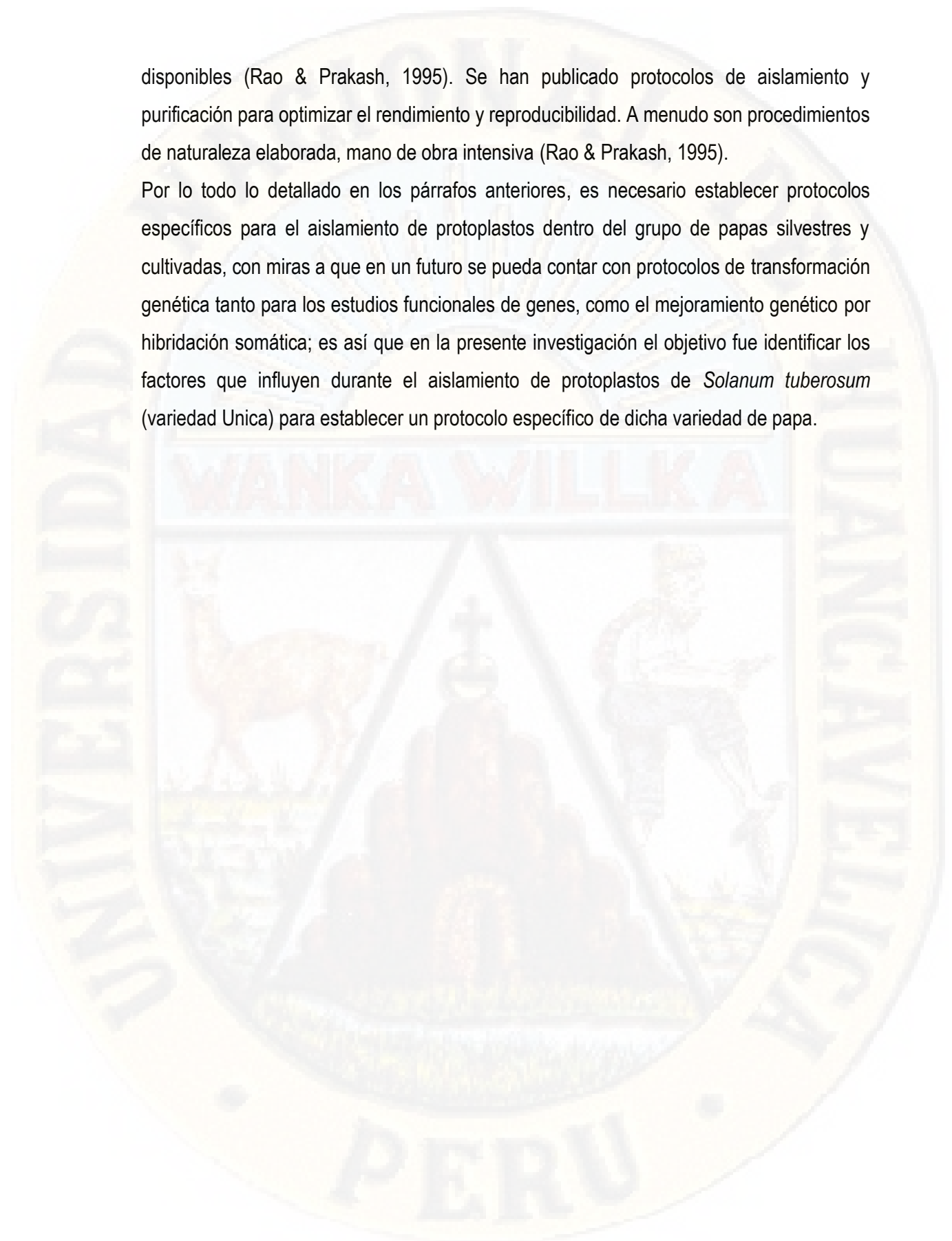
Las nuevas herramientas en biología molecular, cultivo de células vegetales, hibridación somática, han permitido a los científicos comprender mejor las plantas de papa. Esos avances han desbloqueado nuevas oportunidades para la industria de la papa al aumentar el rendimiento, mejorar el valor nutricional del tubérculo (“Papa y biotecnología - Año Internacional de la Papa,” 2008).

Los protoplastos (células vegetales individuales que se han aislado y se ha eliminado enzimáticamente la pared celular) ofrecen un método alternativo para la manipulación genética (Brennan & Millam, 2003) en el cultivo de papa. El desarrollo de sistemas de protoplastos ha aumentado la versatilidad de las (Rao & Prakash, 1995) plantas superiores (Giles, 2013) para su uso en investigación bioquímica y genética (Rao & Prakash, 1995) de células vegetales, y específicamente en el intercambio de información genética a través de la fusión celular, la captación de orgánulos (Gamborg & Holl, 1977) y la transformación de protoplastos (Baltes, Gil-Humanes, & Voytas, 2017; Gamborg & Holl, 1977) con ADN exógeno (Zerbini *et al.*, 2014). El protoplasto aislado se ha utilizado ampliamente en estudios experimentales, a su vez se han vuelto indispensables herramientas en ingeniería genética y mejoramiento de cultivos.

De todos los posibles puntos de partida para la manipulación genética de plantas, solo los protoplastos ofrecen la oportunidad de tomar ventaja de todas las tecnologías ahora

disponibles (Rao & Prakash, 1995). Se han publicado protocolos de aislamiento y purificación para optimizar el rendimiento y reproducibilidad. A menudo son procedimientos de naturaleza elaborada, mano de obra intensiva (Rao & Prakash, 1995).

Por lo tanto lo detallado en los párrafos anteriores, es necesario establecer protocolos específicos para el aislamiento de protoplastos dentro del grupo de papas silvestres y cultivadas, con miras a que en un futuro se pueda contar con protocolos de transformación genética tanto para los estudios funcionales de genes, como el mejoramiento genético por hibridación somática; es así que en la presente investigación el objetivo fue identificar los factores que influyen durante el aislamiento de protoplastos de *Solanum tuberosum* (variedad Unica) para establecer un protocolo específico de dicha variedad de papa.



CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del Problema

Debido al cambio climático, la reducción de la tierra cultivable, el aumento de la población y la frecuente ocurrencia de desastres naturales, la seguridad alimentaria se ha convertido en un tema crucial. Para enfrentar esta situación, el aumento en el suministro de alimentos se ha convertido en una prioridad en la agenda de desarrollo mundial. En términos de valor nutricional, adaptabilidad a entornos diversos y potencial de rendimiento, la papa es un cultivo preferido, especialmente en los países en desarrollo. Según las estadísticas de la FAO, la producción de papa en los países en desarrollo ha aumentado en un 94,6 por ciento en los últimos 15 años. De los cuatro principales cultivos alimentarios (arroz, trigo, papa y maíz), la papa tiene el mejor potencial para aumentar el rendimiento. La papa se cultiva en más de 150 países con un rendimiento promedio de alrededor de 16 toneladas/ha. Sin embargo, los rendimientos en América del Norte y algunos países europeos superan las 40 toneladas/ha; incluso 70 a 80 toneladas/ha se pueden realizar en parcelas experimentales. El rendimiento en los países en desarrollo es inferior a 20 toneladas/ha, incluso inferior a 10 toneladas/ha en algunos países. Existe una gran brecha entre los distintos países entre altos y bajos rendimientos, incluso con la misma variedad de papa. Si las limitaciones pudieran superarse en cierta medida, sería posible aumentar los rendimientos en el mundo en desarrollo de manera significativa ("The importance of Quality potato seed in increasing potato production in Asia and the pacific region," n.d.).

Las especies de *Solanum*, portadoras de tubérculos y sus parientes cercanos son fuentes ricas de germoplasma para la mejora genética. Sin embargo, las barreras de incompatibilidad sexual pueden interferir con la incorporación de nuevos rasgos (por ejemplo, estrés o resistencia a la enfermedad) en los cultivares de patata (Haberlach *et al.*, 1985).

La hibridación somática podría proporcionar métodos alternativos para utilizar este germoplasma. Un requisito previo para tales manipulaciones somáticas es el aislamiento exitoso y el cultivo de protoplastos y la rediferenciación de las células cultivadas en nuevas plantas (Haberlach *et al.*, 1985).

1.2. Formulación del problema

En función a lo descrito se formuló el siguiente problema ¿Cuáles son los factores que intervienen durante el aislamiento de protoplastos en *Solanum tuberosum* (variedad Unica)?

1.3. Objetivos

a) Objetivo general

Identificar los factores que influyen durante el aislamiento de protoplastos de *Solanum tuberosum* (variedad Unica) para establecer un protocolo específico.

b) Objetivo Especifico

Determinar la combinación y concentración óptimas de enzimas para el aislamiento de protoplastos.

Determinar la el tiempo de incubación óptimo para el aislamiento de protoplastos.

1.4. Justificación

El sector mundial de la papa está experimentando cambios importantes. Hasta principios de la década de 1990, la mayoría de las papas se cultivaban y consumían en Europa, América del Norte y los países de la antigua Unión Soviética. Desde entonces, ha habido un aumento dramático en la producción y demanda de papa en Asia, África y América Latina, donde la producción aumentó de menos de 30 millones de toneladas a principios de los años 1960 a más de 165 millones de toneladas en 2007. Los datos de FAO muestran que en 2005, por primera vez, la producción de papa en el mundo en desarrollo superó a la del mundo desarrollado. China es ahora el mayor

productor de papa, y casi un tercio de todas las papas se cosecha en China e India (“Mundo de la papa: producción y consumo - Año Internacional de la Papa,” 2008).

Las técnicas de mejoramiento convencional a través de cruces y selección son muy prolongados y en algunos casos las variedades liberadas no satisfacen las expectativas del consumidor, ni de los productores. En cambio las nuevas variedades logradas mediante las nuevas técnicas (aislamiento de protoplastos), tienen el potencial de producir rendimientos más estables, mejorar la calidad nutricional y facilitar usos industriales no alimentarios (“Papa y biotecnología - Año Internacional de la Papa,” 2008).

Así, para desarrollar un protocolo de transformación genética, es necesario establecer primero un sistema de aislamiento de protoplastos, esto para la especie que se pretenda manipular genéticamente o mejorar. Así mismo, la transformación genética de protoplastos (Heldt & Piechulla, 2011) presenta ventajas como el poder emplear técnicas de transformación química o por medio de electroporación, las cuales permiten una mayor tasa de transformación respecto a otras fuentes de tejido celular. Igualmente, estas técnicas posibilitan la expresión transitoria de genes en protoplastos sin la necesidad de regenerar una planta completa, aproximación muy rápida, versátil y útil con fines de validación funcional de genes (Chawla, 2002).

Por lo tanto, como se hace indispensable contar con protocolos optimizados para el aislamiento y cultivo de protoplastos, asimismo permitir avances y nuevas oportunidades de mejoramiento genético y aprovechamiento del recurso generado en la especie *Solanum tuberosum* (variedad Unica).

Así, con el presente trabajo se generó un aporte de información científica desde de punto de vista citogenético, con miras a que en un futuro se pueda contar con protocolos de transformación genética tanto para los estudios funcionales de genes, como el mejoramiento genético por hibridación

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Espejo *et al.*, (2013) logro aislar protoplastos de *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum* y la especie silvestre *Solanum circaeifolium* Bitter, utilizando macerozyme R-10 (0,25%) y cellulase R-10 (1%) como enzimas para la digestión de la pared celular. Thieme *et al.*, (2008) y Thieme, *et al.*, (1997) aislaron protoplasatos de *Solanum tarnii* con concentraciones enzimáticas de 0,2% macerocima + 1% de celulasa y 0,1% macerozima + 0,8% celulasa respectivamente.

Szczerbakowa *et al.*, (2000) aislaron protoplastos de *Solanum tuberosum*, *Solanum nigrum* y *Solanum bulbocastanum* con concentraciones enzimáticas de 0,4% de celulasa + 0,2% macerozima;

Rokka *et al.*, (1998) aislaron protoplastos de *Solanum brevidens* CPC2451 y dihaploide *Solanum tuberosum* línea 4.dh.45/4 de cv a concentraciones enzimáticas de celulycina al 1% (p/v) (Calbiochem-Behring Ltd., La Jolla, CA, EE. UU.) + 0,1% (p/v) Macerace (Calbiochem-Behring Ltd.).

Puite *et al.*, (1986) aislaron protoplastos de *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja* usando 1% celulasa (Onozuka R-10) y 0,2% de macerozima (R-10).

Dai *et al.*, (1987) aislaron protoplastos de hipocotilos y cotiledones de *Solanum tuberosum* L. (ND860-2, G670-11, BN9815-3), *Solanum ulbocastanum* Dun, *Solanum jamesii* Tort, *Solanum chacoense* Bitt, *Solanum microdontum* Bitt. *Solanum etuburosum* Lindl, usando celulasa Onozuka R-10, macerozyme R-10. A su vez Haberlach *et al.*, (1985), aisló protoplastos de especies silvestres de *Solanum*, cultivares, haploides de cultivares y otros materiales, con una solución enzimática de celulasa y macerozima como enzimas, para la eliminación de la pared celular.

Gamborg & Wetter, (1975) menciona, las enzimas utilizadas en el aislamiento de protoplastos comprenden tres clases generales; celulasas, hemicelulasas y

pectinasas. La preparación comercial de las enzimas generalmente se usa para el aislamiento de protoplastos de papa.

Pectinasa de *Rhizopus* sp; Poligalacturonasa, Poli (1,4-a-D-galacturonida) glicahidrolasa. Es utilizado en la preparación de protoplastos vegetales para digerir la pared celular antes de aislamiento de organelos. Una unidad liberará 1.0 μ mol de ácido galacturónico de ácido poligalacturónico por minuto a pH 4,0 a 25 °C (Life, 2006).

Celulasa de *Aspergillus* sp, es una mezcla de enzimas que contienen alta actividad de celulasa con cierta actividad hemicelulasa. Estas mezclas de enzimas son capaces de degradar celulosa, mananos, xilanos, galactomananos, pectinas y otros polisacáridos. Tiene una actividad de 1000 U/g, producido por la fermentación sumergida de un agente genéticamente modificado (Microorganismo *Aspergillus*). Un producto de Novozyme Corp (Life, 2006).

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. *Solanum tuberosum* (CIP 392797.22 UNICA)

Es una variedad resistente a PVY. La planta tiene un período vegetativo medio con hábito de la planta decumbente y flores lilas con una superficie axial perspicacia blanca. La variedad tiene una amplia adaptación a los trópicos en días cortos. Los tubérculos son oblongos con pulpa de nata son excelentes para procesarlos como chips (patatas fritas) (CIP, 2018). La variedad se realizó en Perú en 1998.

a) Origen y distribución geográfica

CIP 392797.22 es una variedad mejorada de papa, “resultado de las investigaciones participativas con los agricultores (Asociaciones de Productores), las instituciones nacionales de investigación en el sector agrícola (Universidad Nacional “San Luis Gonzaga” de Ica) y el Centro Internacional de la Papa (CIP); seleccionada y evaluada por el CIP durante más de 7 años” (Hernández, Rodríguez Benavides, Pineda Colorado, Valbuena Benavides, & Estrada Ramos, 1996; Rosales, Espinosa, & Bonierbale, 2007). Sus orígenes proviene de cruza siguiendo el diseño

genético (Linea x Probador), resaltando al final “el clon identificado con el código del investigador o campo: C92.140 y con el código del CIP No. 392797.22, posteriormente fue denominado la variedad UNICA (Hernández *et al.*, 1996; Rosales *et al.*, 2007). “Vietnam, Laos, Uzbekistán, Perú; son países donde se cultiva” (CIP, 2018) la variedad unica.

- **Variedad única en Perú**

La variedad se encuentra distribuida en la sierra y costa del Perú, normalmente las zonas productoras de la variedad única son Junín, Arequipa, Huaral, Barranca, Ayacucho, Cuzco y otras zonas.

b) Taxonomía

La papa cultivada pertenece a la serie Tuberosa. El vínculo más estrecho con las especies silvestres se encuentra dentro de la misma serie en el “complejo brevicaule”, grupo de especies diploides morfológicamente variable. El origen de la papa cultivada ha sido descrito como el resultado de numerosas hibridaciones entre miembros de este complejo, seguidas de duplicaciones cromosómicas que dieron lugar al estado tetraploide (“Potato Biology and Biotechnology,” n.d.). La variedad única está dentro de las solanáceas, genero *Solanum*, especie *tuberosum*.

c) Descripción varietal.

En general, la planta de la variedad UNICA es herbácea con hábito de crecimiento erecto, los tallos son gruesos de color verde oscuro, alcanzando una longitud entre 0,90 a 1,20 metros Las hojas son compuestas y se distribuyen en espiral sobre el tallo. La forma de la hoja es disectada, con cinco pares de folíolos laterales y un par de interhojuelas sobre los peciólulos. Tiene floración moderada entrada la temporada de primavera en Costa, escasa floración en el invierno en Costa y ausencia de floración en condiciones de Sierra (mayor a 2.000 msnm.); las flores son violetas y no forman bayas en épocas con bajas temperaturas. Los

estolones son alargados en el invierno o bajo condiciones de Sierra; ligeramente cortos y pegados al tallo en la primavera. Los tubérculos son oblongos y alargados, con ojos superficiales y en la parte del ojo apical es semi-profundo. Se forman ligeras protuberancias en los ojos hacia finales de la primavera, volviéndose más liso en el invierno o bajo condiciones de Sierra. Estas protuberancias se presentan también cuando los niveles de nitrógeno elevados, cuando hay períodos de estrés hídrico prolongados o cuando se retrasa el período de cosecha. La piel del tubérculo es de color rosado, que toma una tonalidad más clara hacia finales de la primavera en la Costa y es roja en condiciones de Sierra (Hernández *et al.*, 1996; Rosales *et al.*, 2007).

d) Comportamiento agronómico.

El período de dormancia de la semilla alcanza los 40 a 50 días, presenta ligera dominancia apical. El período vegetativo es precoz (70 a 90 días) en condiciones de trópico alto o Sierra (2.000 a 3.800 msnm) para fines de multiplicación de semilla. Presenta características de semi-precoz (90 a 110 días) en condiciones de trópico bajo como la Costa o los Valles Interandinos (0 a 1.500 msnm.)(Rosales *et al.*, 2007).

Alto rendimiento potencial (50 t ha⁻¹). Para el invierno en zonas de Costa Peruana (trópico bajo) y en épocas húmedas de la zona Sierra (trópico alto) se puede alcanzar el rendimiento potencial. En la primavera y en la época seca de las respectivas zonas se reduce el rendimiento. Comercialmente se pueden lograr rendimientos promedios de hasta 40 t ha⁻¹. Posee ligera tolerancia a sales y a temperaturas cálidas, pudiendo tuberizar con temperaturas nocturnas de hasta 16 °C (Hernández *et al.*, 1996).

Tabla 1. Rasgos de reacción de la variedad única.

RASGOS DE REACCIÓN	
Virus de la papa X (PVX)	Resistente

Virus de la papa Y (PVY)	Resistencia extrema
Virus del rollo de hojas de papa (PLRV)	Resistente
Marchitez bacteriana (BW)	Moderadamente susceptible
Nematodo del nudo de la raíz (RKN)	Moderadamente resistente

Fuente. Catalogue of CIP potato varieties(CIP, 2018).

e) Usos

UNICA es para el consumo en fresco, sin embargo también presenta atributos para el procesamiento de papas peladas y cortadas en tiras, utilizada comúnmente en el Perú como guarnición para los pollos a la brasa, teniendo un 58% de rendimiento en procesamiento para tiras mayores de 8 cm.

Tabla 2. Rendimiento de postcosecha de la variedad única.

Rendimiento postcosecha	
Materia seca (%)	21
Tasa de absorción de aceite (%)	39

Fuente. Catalogue of CIP potato varieties(CIP, 2018).

Tabla 3. Concentraciones de nutrientes en tubérculos de la variedad única.

Concentraciones de nutrientes en tubérculos	
Vitamina C (mg / 100g, base de peso seco) min	36,38
Vitamina C (mg / 100g, base de peso seco) max	164,34

Vitamina C (mg / 100g, base de peso seco)	77,78
Fe (mg / kg, base de peso seco) min	13,02
Fe (mg / kg, base de peso seco) máx.	27,00
Fe (mg / kg, base en peso seco)	19,58
Zn (mg / kg, base de peso seco) min	6,19
Zn (mg / kg, base de peso seco) máx.	25,86
Zn (mg / kg, base en peso seco)	18,12

Fuente. Catalogue of CIP potato varieties(CIP, 2018).

2.2.2. Protoplastos

Hastein introdujo el término protoplasto en 1880 para designar la materia viva encerrada por la membrana celular de la planta (Chawla, 2002). Los protoplastos vegetales aislados son células "desnudas" a las que se les ha eliminado la pared celular (Hull, 2014; Park, & Craven, 2013) por acción mecánica (Bengochea, 2012; Davey *et al.*, 2005; Power & Davey, 1990) o por digestión enzimática (Haberlach *et al.*, 1985). Por lo tanto, retienen todos los organelos celulares normales más el núcleo; este último es capaz de expresar la totipotencia mediante la conversión del protoplasto en la planta regenerada utilizando tecnología de cultivo de tejidos (Power & Davey, 1990).

a) Tipos de aislamiento

- Método mecánico

En este método, las células grandes y altamente vacuoladas de tejido de almacenamiento podrían usarse para la insolación. Las células se plasmolizan en una solución isoosmótica que da como resultado la eliminación de los contenidos en el centro de la célula. Posteriormente, el tejido se diseca y deplasmoliza para realizar el protoplasto preformado (Chawla, 2002).

- Método enzimático

Cocking (Chawla, 2002) en 1960 demostró la posibilidad del aislamiento enzimático de protoplastos de plantas superiores. El método consiste en el tratamiento de tejidos con una mezcla de enzimas (celulasa, hemicelulasa, pectinasa) que degradan la pared celular en una solución, que contienen estabilizadores osmóticos. Reinoso hace referencia a tres factores de importancia para tener un éxito con este método, el primero es los tipos de enzimas, la concentración y osmolaridad del medio donde se lleva a cabo el aislamiento y por último el tipo de tejido vegetal que se utiliza.

- Enzimas

Las enzimas utilizadas en el aislamiento de protoplastos comprenden tres clases generales; celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Gamborg & Holl, 1977).

Generalmente se usa la preparación comercial de las enzimas. El rango de fuentes disponibles es limitado. Las preparaciones no son puras y contienen otras enzimas como proteasas, lipasas y nucleasas, algunas de las cuales pueden tener efectos nocivos (Gamborg & Wetter, 1975). Las enzimas permiten la liberación exitosa de los protoplastos de la mayoría de los tejidos, sin embargo se advierte que los métodos con demasiados pasos implican a menudo la introducción de contaminación en los protoplastos (Rao & Prakash, 1995).

- Buffer de aislamiento

La mezcla de incubación utilizada en el aislamiento de protoplastos consiste en las enzimas disueltas en una solución que contiene algunas sales o un medio de cultivo, un tampón y un estabilizador osmótico. El calcio (2-6 mM) es un ingrediente esencial y el fosfato (0.5-2.0 mM) es beneficioso en la preservación de la viabilidad de los protoplastos (Gamborg & Holl, 1977).

Los estabilizadores osmóticos más comunes son sorbitol, manitol, glucosa y sacarosa. A menudo se usan en mezclas y la glucosa y / o sacarosa siempre se incluyen como fuente de carbono. La osmolaridad óptima varía de 0.3 a 0.7 M. El pH predominante es crítico. Un pH ácido en el rango de 5.0-6.0 es óptimo (Gamborg & Holl, 1977).

- Fuente de obtención de protoplastos

El tipo y estado fisiológico de la fuente de protoplastos son factores críticos que pueden influir de sobremanera en el éxito del procedimiento de aislamiento y cultivo de protoplastos (CIAT, n.d.; Davey *et al.*, 2005). Para el aislamiento de protoplastos, es necesario utilizar células de tejidos en crecimiento activo. Las condiciones de cultivo del material de origen deberán ser estandarizadas para poder obtener repetitivamente, altos rendimientos de protoplastos viables. El material propagado in vitro de plantas estériles, generalmente se considera superior, al compararse con plantas cultivadas en el campo o en invernadero (CIAT, n.d.).

- Oscuridad, temperatura y tiempo de acción

La oscuridad, la temperatura y el tiempo de acción son elementos claves a la hora del aislamiento, estos tres factores influyen el comportamiento de las enzimas por lo tanto la liberación eficiente y estable de los protoplastos (Rao & Prakash, 1995).

La mayoría de cultivos en los que se usan concentraciones altas de enzimas se tiende a aislar protoplastos en tiempos reducidos, la acción enzimática depende de la temperatura y la concentración de las enzimas, y el tiempo en el que pueden actuar logra ser muy variable (entre 42 a 30 minutos y 35 horas); la incubación se realiza a temperaturas entre 25 a 30°C (Chawla, 2002).

b) Usos de los protoplastos

En el contexto de la manipulación genética de plantas, se utiliza para eludir las barreras de incompatibilidad sexual que se producen de manera natural, a su vez también para absorber ADN extraño, organelas celulares, bacterias y partículas de virus (Nair, 2013). En cuanto a la absorción de ADN aislado en protoplastos proporciona la base para la transformación nuclear transitoria y estable; también la transformación de orgánulos para generar plantas transplastómicas. Los protoplastos aislados también se explotan en numerosos estudios misceláneos relacionados con la función de la membrana, la estructura celular, la síntesis de productos farmacéuticos y las evaluaciones toxicológicas (Davey *et al.*, 2005). Asimismo podría enfocarse en un primer plazo, a estudios de expresión transitoria de transgenes, estudios funcionales de genes y elementos reguladores de los mismos, o estudios de localización e interacción de proteínas, como herramientas complementarias de genómica funcional (Díaz *et al.*, 2004).

2.3. Hipótesis

a) Hipótesis general

Los diferentes factores influirán durante el aislamiento de protoplastos de *Solanum tuberosum* (variedad Unica).

2.4. Definición de Términos

Aislamiento.- Aislamiento es la acción y efecto de aislar. Este verbo refiere a dejar algo solo y separado de otras cosas (“Definición de aislamiento,” 2018).

Protoplastos.- Son células vegetales aisladas que carecen de las paredes rígidas de celulosa que se encuentran en el tejido intacto (Hull, 2014). Asimismo los protoplastos son células vegetales que han sido despojadas de sus paredes celulares mediante la acción de pectinasas y celulasas (Zerbini *et al.*, 2014).

Especie.- Cada grupo que se dividen los géneros y se componen de individuos que, además de los caracteres genéricos, tienen en común otros caracteres por los cuales

se asemejan entre si y se distinguen de los demás especies. La especie se subdivide a veces en variedades ("Especie," 2018).

Cultivar.- Un cultivar es un grupo de plantas seleccionadas artificialmente por diversos métodos a partir de un cultivo más variable, con el propósito de fijar en ellas caracteres de importancia para el obtentor que se mantengan tras la reproducción ("Cultivar," 2017).

2.5. Definición operativa de variables e indicadores

a) Variable independiente

En la presente investigación, las variables independientes fueron las diferentes concentraciones enzimáticas y tiempos de incubación que actuaron durante el aislamiento de protoplasto.

b) Variable dependiente

La variable dependiente fue, células de *Solanum tuberosum* (variedad Unica).

Tabla 4. Definición operativa de variables e indicadores

DEFINICION NOMINAL	VARIABLES	DIMENSIONES / VALORES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	ITEMS
VARIABLES INDEPENDIENTES	Concentraciones enzimáticas (Pectinasa y celulasa).	Células de <i>Solanum tuberosum</i> (variedad Unica)	Soluciones de enzimáticas de: Pec0,2% + cel0.2% Pec0,3% + cel0.5% Pec0,4 + cel1% Pec0,5 + cel1,5	Pesado, y volumétrico	Contadas y cm ³
	Tiempos de incubación	Células de <i>Solanum tuberosum</i> (variedad Unica)	Diferentes tiempos: 14, 15, 16, 17 y 18 horas.	Númerico	Contadas
VARIABLE DEPENDIENTES	Células de <i>Solanum tuberosum</i> (variedad Unica)	Los protoplastos	Numero de protoplastos.	Cuantitativas y continuas	Contadas

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Ámbito de estudio

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología y Recursos Genéticos perteneciente a la Universidad Nacional de Huancavelica.

3.2. Tipo de Investigación

Según Cursio, (2002), la investigación descriptiva, “buscan indagar la incidencia y los valores en que se manifestaron una o más variables”. Asimismo Cerda citado por Bernal señala tradicionalmente se define la palabra describir como el acto de representar, reproducir o figurar a personas, animales o cosas...”(Bernal, 2002).

Por lo tanto, el presente trabajo de investigación correspondió al tipo de investigación descriptivo.

3.3. Nivel de Investigación

El nivel de investigación fue básico, ya que se obtuvo nuevos conocimientos.

3.4. Método de Investigación

El método de investigación es el científico.

3.4.1 Metodología de Investigación

En esta investigación científica se empleó el método científico para poder estandarizar que tipo de concentración de enzimas (Celulaza from *Aspergillus sp* y pectinasa from *Rhizopus sp.*) y que tiempo de incubación es más eficaz para el aislamiento de protoplastos.

La presente metodología es una modificación y adaptación de los métodos señalados por Gamborg, (1975); Shepard y Totten, (1977); Pellow y Towill, (1984); Haberlach *et al.*, (1985); Dai *et al.*, (1987); Ochatt y Power, (1992); Rao y Prakash, (1995); Rokka *et al.*, (1998,2000) y Espejo *et al.*, (2013), las cuales estuvo constituida por las siguientes etapas:

- a) Obtención y preparación del material vegetal.

- b) Desinfección del material vegetal.
- c) Pretratamiento a la muestra vegetal.
- d) Digestión celular del material vegetal.
- e) Purificación.
 - Identificación de los protoplastos.
- f) Conteo celular.

3.5. Diseño de Investigación

El estudio no presento un diseño específico. Sin embargo se ensayaron cuatro concentraciones enzimáticas T1 (Pectinasa 0,2%, Celulasa 0,2%), T2 (Pectinasa 0,3%, Celulasa 0,5%), T3 (Pectinasa 0,4%, Celulasa 1%) y T3 (Pectinasa 0,5%, Celulasa 1,5%). Y sé encubó las muestras por un espacio de tiempo de 14 a 18 h; con el fin de estandarizar el protocolo.

3.6. Población, Muestra y Muestreo

Población:

Según Cursio, (2002) la población, es la totalidad de individuos o elementos en los cuales puede presentarse determinada característica susceptible de ser investigada. Asimismo Francica citado por Bernal, (2002), la población es “el conjunto de todos los elementos na los cuales se refiere la investigación. Se puede definir también como el conjunto de todas las unidades de muestreo”. Para Jany citado por Bernal, (2002), la población es “la totalidad de elementos o individuos que tienen ciertas características similares y sobre las cuales se desea hacer interferencia”.

Por lo tanto, la población estuvo dado por todas las células que integran una planta de *Solanum tuberosum* (Variedad Unica).

Muestra:

Según Bernal, (2002), muestra “es la parte de la población que se selecciona, y de la cual realmente se obtiene la información para el desarrollo del estudio y sobre la cual se efectuaran la medición y la observación de las variables objeto de estudio”.

Por lo tanto, la muestra estuvo constituida por 1 g de hojas de *Solanum tuberosum* (Variedad Unica).

Muestreo:

Según Cursio, (2002), muestreo no probabilístico es “un tipo de muestra que no sigue el proceso aleatorio o al azar, que se caracteriza porque el investigador selecciona su muestra siguiendo algunos criterios identificados para los fines de investigación que desea realizar”.

Por lo tanto el tipo de muestro correspondió al no probabilístico.

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la recolección de datos en el trabajo de investigación: se utilizó la técnica de observación y medición según la variable que se evaluó.

Instrumentos de recolección de datos: los instrumentos utilizados en la recolección de datos, fueron adaptados de Gamborg, (1975); Shepard y Totten, (1977); Pellow y Towill, (1984); Haberland *et al.*, (1985); Dai y *et al.*, (1987); Ochatt y Power, (1992); Rao y Prakash, (1995); Rokka *et al.*, (1998,2000) y Espejo *et al.*, (2013).

Instrumentos a utilizarse

- Erlenmeyer
- Pinzas
- Vaso de precipitación
- Espátulas
- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- pH metro
- Microscopio.
- Contador
- Balanza de precisión
- Cuaderno de apuntes

3.8. Procedimiento de Recolección de Datos

a) Obtención y preparación del material vegetal

Para la elección del material biológico de partida de *Solanum tuberosum* (variedad Unica) se obtuvo del Instituto de Nacional de Innovación Agraria – Santa Ana.

Constituido por magentas, que incluían plántulas micro propagadas vía cultivo in vitro. Las plántulas se dejaron una noche en oscuridad antes de extraer las hojas. Después de ello se extrajeron varias hojas jóvenes.

Para el manejo del material vegetal se tomaron todas las medidas de esterilidad del material de vidrio, pinzas, bisturí, y demás utensilios para el trabajo en cámara de flujo laminar.

b) Desinfección del material vegetal

Sé disecciono las hojas de las plántulas, luego fueron sumergidas en una solución de detergente comercial (Ace) a razón de 5 g x L, durante 5 minutos, luego se sumergieron en una solución una de NaClO al 4% durante 2 minutos para finalmente realizar 3 lavados sucesivos a las hojas con agua destilada durante 3 minutos cada lavado.

c) Pretratamiento del material vegetal

Después del lavado, las hojas sé dejaron sumergidas en una solución de sorbitol al 0,5 M por un espacio de tiempo de 1-2 horas en oscuridad como describe (Espejo *et al.*, 2013).

d) Digestión celular del material vegetal

Para la digestión celular se preparó una solución que contenía 700 mg de CaCl₂, 10 mg de Na₂HPO₄ y 0,5 M de sorbitol. A dicha solución se le añadió diferentes concentraciones de enzimas [celulasa de *Aspergillus* sp. (0,2; 0,5; 1 y 1,5 %) y Pectinasa de *Rhizopus* sp. (0,2; 0,3; 0,4 y 0,5%)], ajustando el pH a 5.6. Luego de pretratamiento, sé tomo 1g de hojas, y sé realizo cortes transversales a las hojas, y se añadió la solución enzimática. Para finalmente llevar a la incubadora a una temperatura establecida de 28 °C, durante horas establecidas (14,15, 16, 17 y 18 H).

e) Purificación de protoplastos

Después de transcurrido el tiempo de incubación se filtró la solución en un filtro naylor de 50 um. Luego se centrifugo a 1000 rpm por 10 min y se realizó dos lavados sucesivos con 0,4 M de sorbitol y 0,1 mM de CaCl₂ (Radke & Grun, 1986).

- Identificación de los protoplastos.

Sé extrajo 50 μ l de la parte resuspendida de la solución de protoplastos y sé coloco en un portaobjetos, luego sé cubrió con un cubreobjetos; y, sé llevo a un microscopio (Leica) para la identificación.

f) Conteo celular

Para determinar la cantidad de los protoplastos se cogió 20 μ l de la suspensión de protoplastos asilados con un micropipetor, y esta muestra se colocó en la cámara de Neubauer.

Para calcular el número de protoplastos se aplicó la siguiente formula:

$$Concentracion \left(\frac{prtpls.}{ml} \right) = \frac{n^{\circ} \text{ de protoplastos} * 10000}{n^{\circ} \text{ de cuadrados contabilizados}}$$

3.9. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Para los análisis estadísticos sé realizó con los softwares de Minitab 16, SPSS 22, Rstudio y Microsoft Excel 2013 y se utilizó la prueba de normalidad, prueba de homogeneidad de varianzas, prueba de Kruskal Wallis y la prueba de Games - Howell; según la variable que se evaluó.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Factores de aislamiento de protoplastos

Se ensayaron cuatro concentraciones enzimáticas T1 (Pectinasa 0,2%, Celulasa 0,2%), T2 (Pectinasa 0,3%, Celulasa 0,5%), T3 (Pectinasa 0,4%, Celulasa 1%) y T3 (Pectinasa 0,5%, Celulasa 1,5%).

Se incubó las muestras en un espacio de tiempo de 14 a 18 h; con el fin de estandarizar el protocolo.

Después de realizar la prueba de normalidad se encontró que los datos no se distribuyeron de forma normal por lo tanto se realizó la prueba de Kruskal Wallis y luego de ello se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas y se decidió realizar la prueba de Games - Howell para comparar medias de los tratamientos e identificar cual fue el tratamiento más óptimo.

4.2. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos

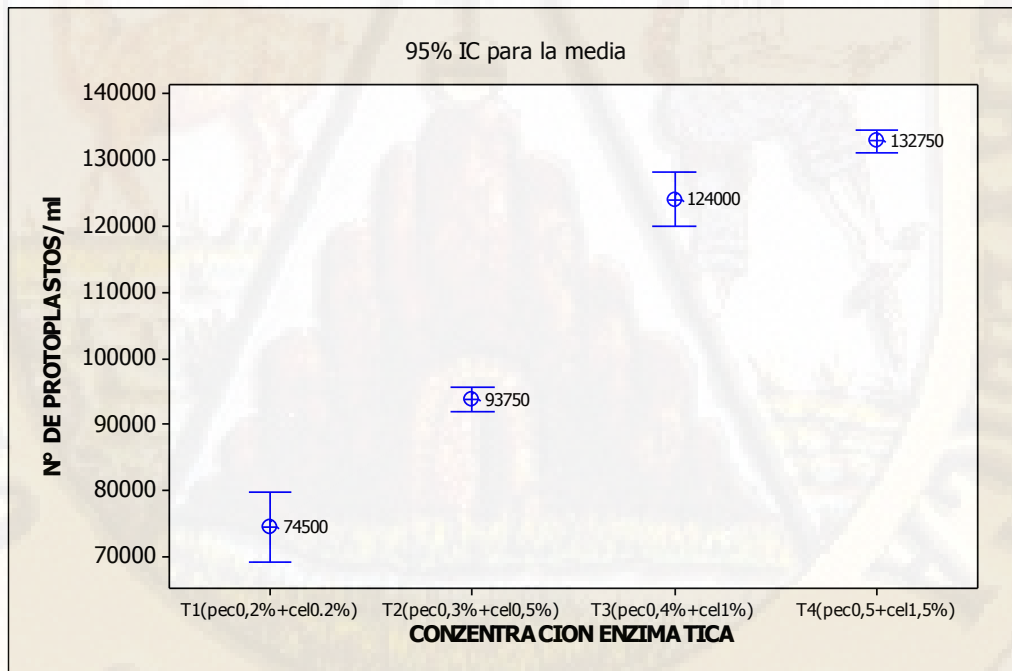
Mediante la prueba de Kruskal Wallis se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones enzimáticas para la variable evaluada (véase tabla 5). La combinación de pectinasa al 0,5% - celulasa al 1,5% tuvo una media mediana alta (véase Gráfica 1; 2; 3; 4 y Gráfica 5) siendo la óptima en este caso (véase Anexo 1, 2, 3, 4 y 5).

En la gráfica 1, 2, 3, 4 y 5 se observa que la concentración pectinasa 0,3% mas celulasa 0,5% es mejor respecto a la concentración pectinasa 0,2% mas celulasa 0,2%, asimismo la concentración pectinasa 0,4% mas celulasa 1% es mejor con respecto a las concentraciones pectinasa 0,2% mas celulasa 0,2% y pectinasa 0,3% mas celulasa 0,5%. La concentración enzimática pectinasa 0,5% mas celulasa 1,5% fue mejor respecto a las otras concentraciones enzimáticas.

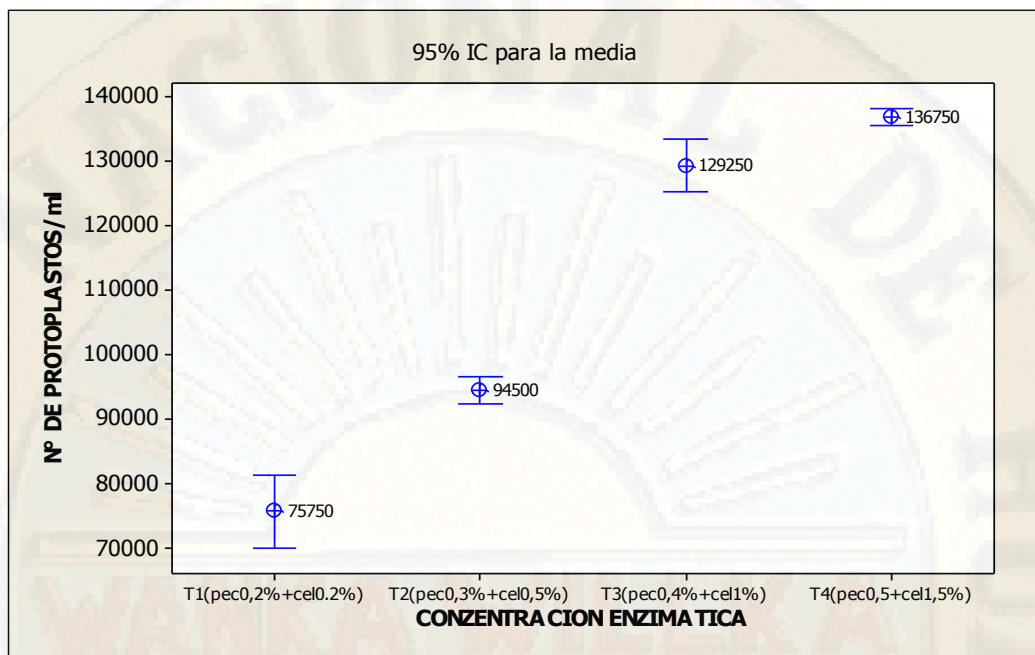
Tabla 5. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a la concentración enzimática.

CONCENTRACION ENZIMATICA	N	HORA	MEDIANA	HORA	MEDIANA	HORA	MEDIANA	HORA	MEDIANA	HORA	MEDIANA
T1(pec0,2% + cel0,2%)	10	14	77500	15	76250	16	75000	17	76250	18	78750
T2(pec0,3% + cel0,5%)	10	14	93750	15	95000	16	95000	17	96250	18	97500
T3(pec0,4% + cel1%)	10	14	123750	15	128750	16	132500	17	138750	18	142500
T4(pec0,5% + cel1,5%)	10	14	132500	15	137500	16	140000	17	145000	18	147500
			P=0.000*		P=0.000*		P=0.000*		P=0.000*		P=0.000*

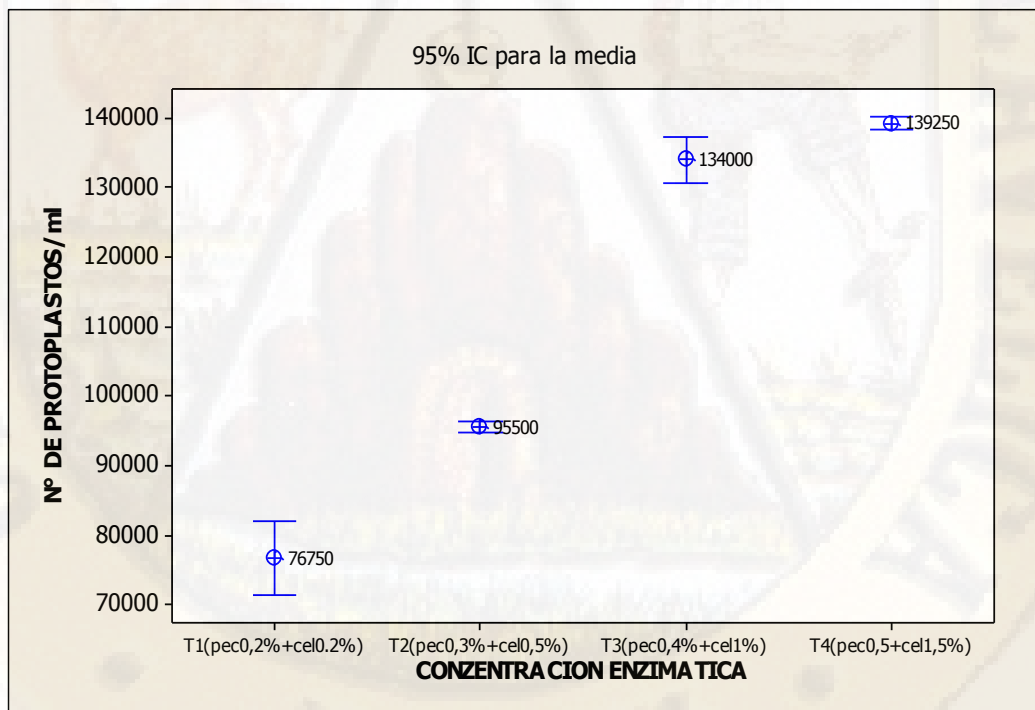
* Se utilizó la prueba de Kruskal wallis a un error de 0,5 de error.



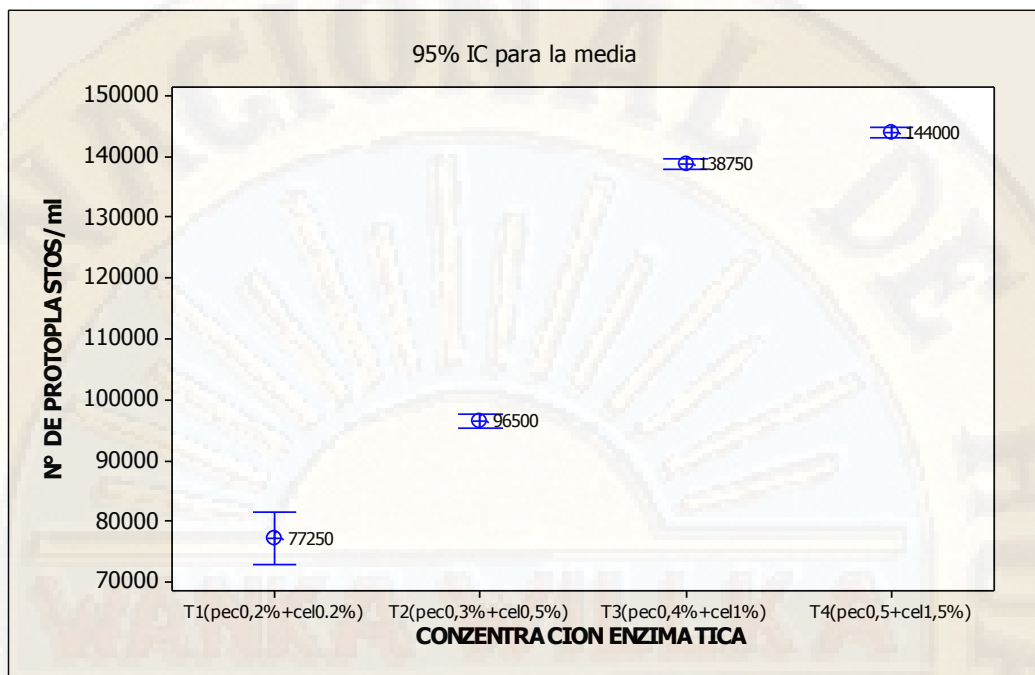
Gráfica 1. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 14 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)



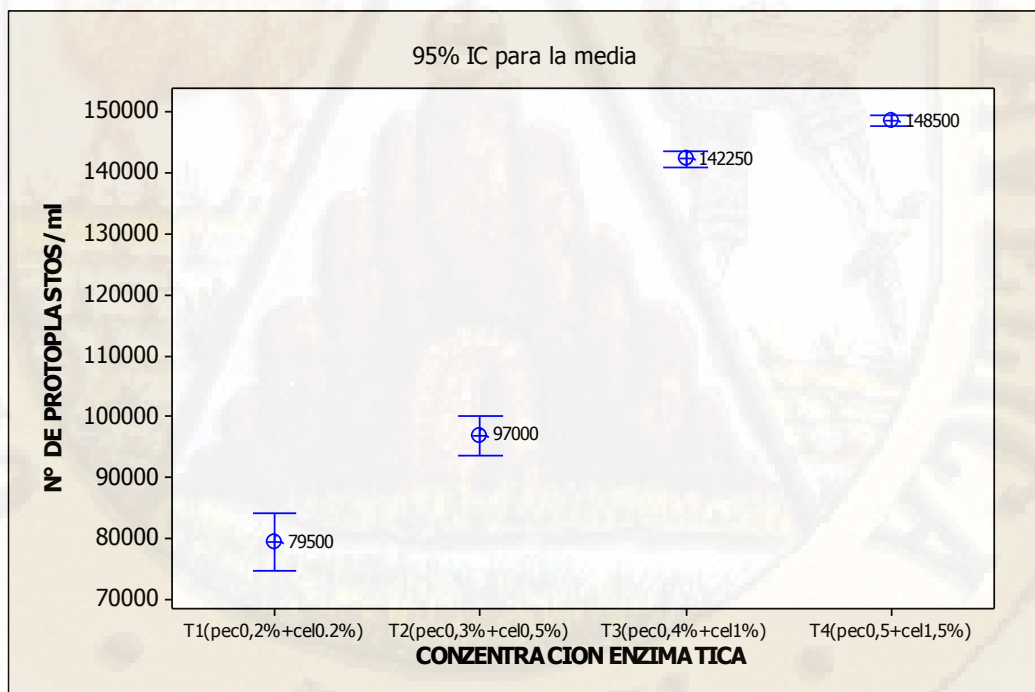
Gráfica 2. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 15 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)



Gráfica 3. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 16 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)

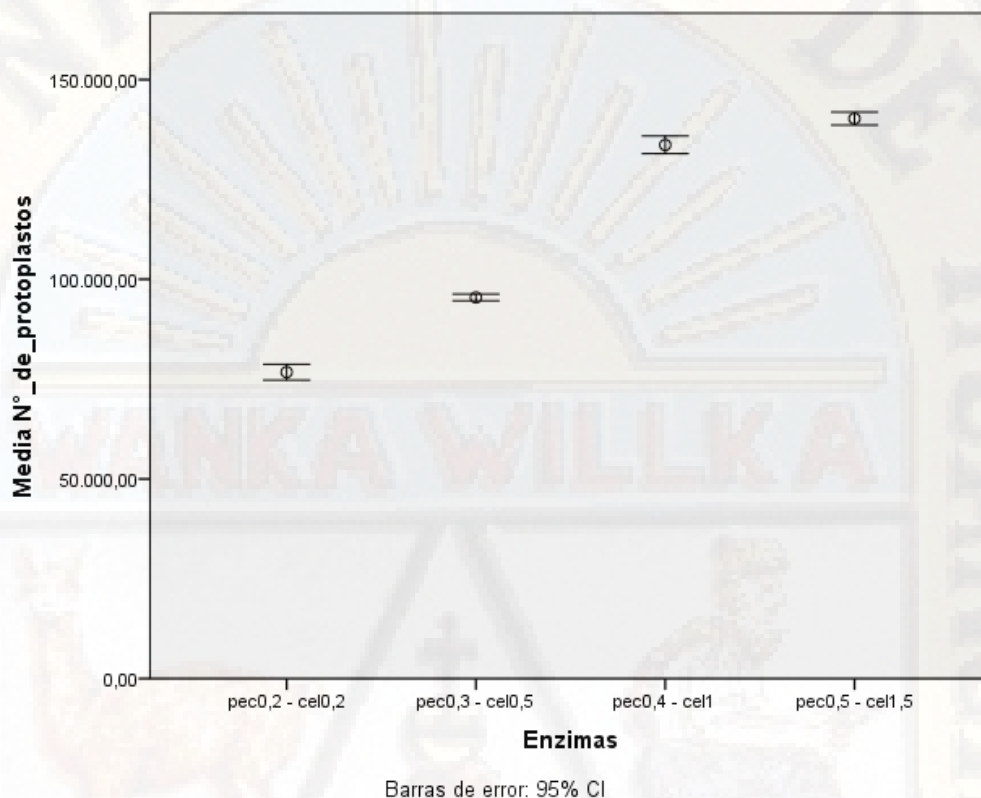


Gráfica 4. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 17 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)



Gráfica 5. Efecto de la concentración enzimática en el número de protoplastos/ml a 18 horas. (pec = pectinasa, cel = celulasa)

También se realizó una prueba de Games – Howell, para evaluar las diferencias entre las concentraciones enzimáticas (Gráfica 6 y Anexo 10).



Gráfica 6. Prueba de Games – Howell para número de protoplastos respecto a concentraciones enzimáticas (pec = pectinasa, cel = celulasa).

4.3. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplasto

Se realizó la prueba Kruskal Wallis para observar si existen diferencias entre los tiempos para el número de protoplastos, donde se observó, a concentraciones de pectinasa al 0,2% mas celulasa al 0,2% y pectinasa al 0,3% mas celulasa al 0,5% no existe diferencias significativas en los tiempos de incubación en relación al número de protoplasto (véase Tabla 6, Gráfica 7 y 8; y, Anexo 6 y 7). Sin embargo a concentraciones de pectinasa al 0,4% mas celulasa al 1% y pectinasa al 0,5% mas celulasa al 1,5%, a 18 horas se presentaron los mejores resultados para el aislamiento de protoplastos, presentando mayor cantidad con pectinasa al 0,5% mas celulasa al 1,5% respectivamente (véase Tabla 6, Grafica 9 y 10, Anexo 8 y 9). Asimismo se realizó

la prueba de Games – Howell (véase Anexo 11) para analizar el comportamiento del tiempo de incubación respecto al número de protoplastos aislados.

Tabla 6. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto al tiempo de incubación.

HORA	N	C. ENZIMA	MEDIANA	C. ENZIMA	MEDIANA	C. ENZIMA	MEDIANA	C. ENZIMA	MEDIANA
14	10	T1(pec0,2% + cel0,2%)	77500	T2(pec0,3% + cel0,5%)	95000	T3(pec0,4% + cel1%)	123750	T4(pec0,5% + cel1,5%)	132500
15	10	T1(pec0,2% + cel0,2%)	76250	T2(pec0,3% + cel0,5%)	95000	T3(pec0,4% + cel1%)	128750	T4(pec0,5% + cel1,5%)	137500
16	10	T1(pec0,2% + cel0,2%)	75000	T2(pec0,3% + cel0,5%)	96250	T3(pec0,4% + cel1%)	132500	T4(pec0,5% + cel1,5%)	140000
17	10	T1(pec0,2% + cel0,2%)	76250	T2(pec0,3% + cel0,5%)	97500	T3(pec0,4% + cel1%)	138750	T4(pec0,5% + cel1,5%)	145000
18	10	T1(pec0,2% + cel0,2%)	78750	T2(pec0,3% + cel0,5%)	93750	T3(pec0,4% + cel1%)	142500	T4(pec0,5% + cel1,5%)	147500

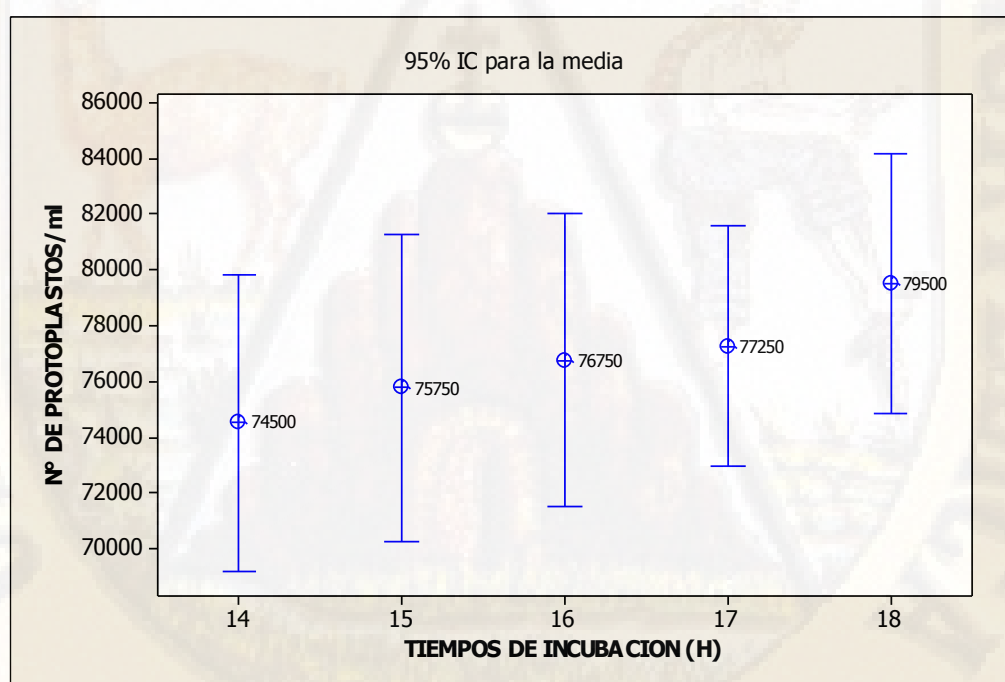
P = 0.765*

P = 0.089*

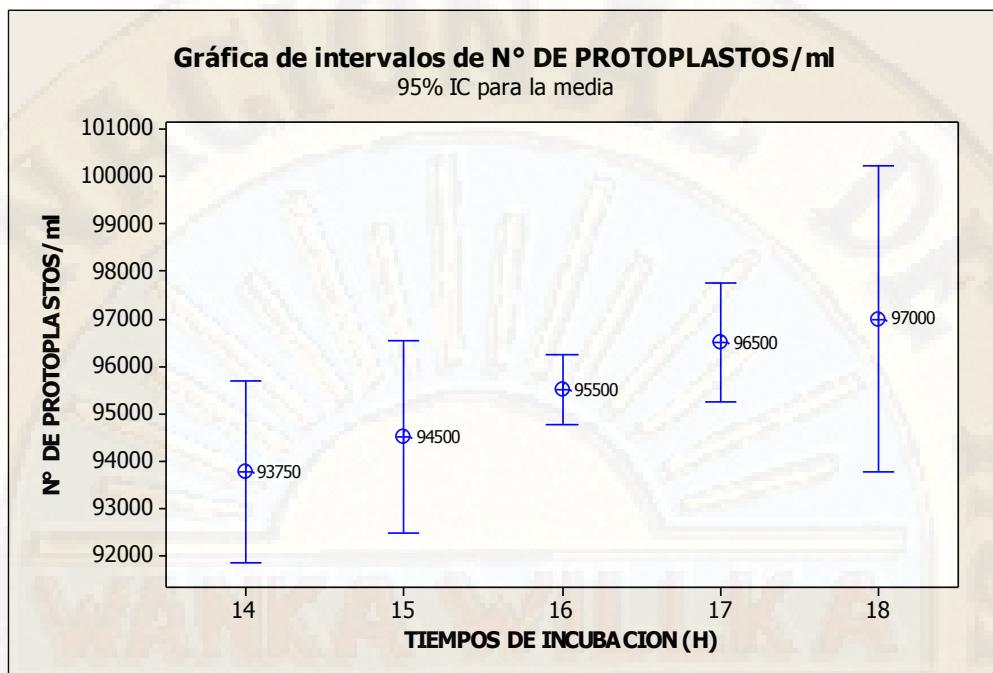
P = 0.000*

P = 0.000*

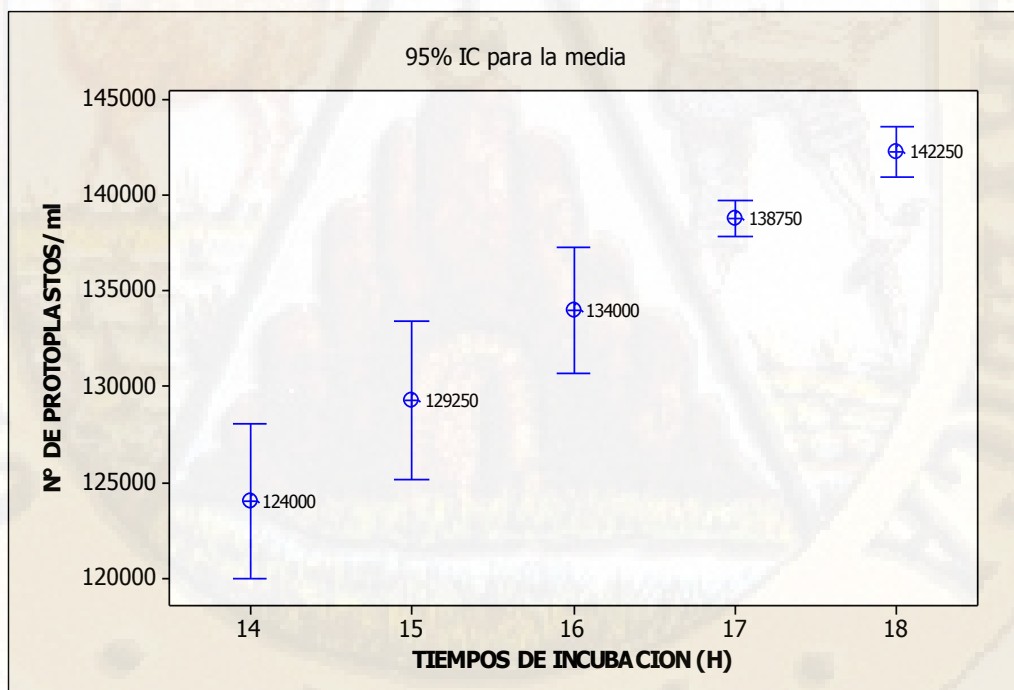
* Se utilizó la prueba de Kruskal wallis a un error de 0,5 de error.



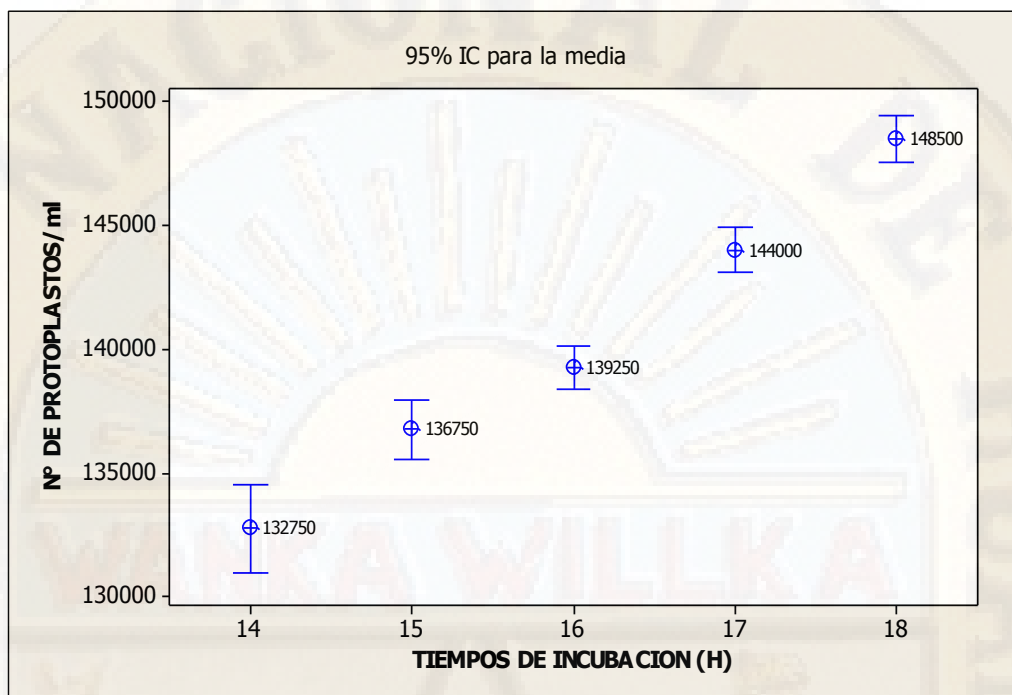
Gráfica 7. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,2% mas celulasa al 0,2%.



Gráfica 8. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,3% mas celulasa al 0,5%.



Gráfica 9. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,4% mas celulasa al 1%.



Gráfica 10. Efecto del tiempo de incubación en el número de protoplastos/ml a pectinasa al 0,5% mas celulasa al 1,5 %.

4.4. Discusión

En los experimentos realizados se observó que la metodología aplicada resultó satisfactorio para el aislamiento de protoplastos, para aquello se evaluó cuatro concentraciones enzimáticas (Pectinasa 0,2% + Celulasa 0,2%; Pectinasa 0,3% + Celulasa 0,5%; Pectinasa 0,4% + Celulasa 1% y Pectinasa 0,5 + Celulasa 1,5).

Sé logró recuperar la mayor cantidad de protoplastos con la concentración enzimática de Pectinasa de *Rhizopus* sp al 1 por ciento más Celulasa de *Aspergillus* sp al 1,5 por ciento, a razón de 148500 protoplastos/ml, estos resultados se encuentra dentro del rango obtenido por Espejo *et al.* (2013).

Se concuerda con Thieme *et al.*, (1997,2008) en el número de protoplastos por mililitro, pero se discrepa con el tipo de enzima, ya que utilizo macerozima mas celulasa.

Se concuerda con Szczerbakowa *et al.*, (2000) en el número de protoplastos por mililitro, pero se discrepa con el tipo de enzima, ya que utilizo macerozima mas celulasa en *Solanum tuberosum*, *Solanum nigrum* y *Solanum bulbocastanum*.

Se concuerda con Rokka *et al.*, (1998) en el número de protoplastos por mililitro, pero se discrepa con el tipo de enzima, ya que utilizó celulsina (Calbiochem-Behring) más Macerase (Calbiochem-Behring) en *Solanum brevidens* y dihaploide *Solanum tuberosum* línea 4.dh.45/4.

Se concuerda con Puite *et al.*, (1986) en el número de protoplastos por mililitro, pero se discrepa con el tipo de enzima, ya que utilizó macerozima (Onozuka R-10) más celulasa (Onozuka R-10) en *Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*

Se concuerda con Dai *et al.*, (1987) en el número de protoplastos por mililitro, pero se discrepa con el tipo de enzima, ya que utilizó macerozima R-10 (Yakult Pharmaceutical Industry) más celulasa (Onozuka R-10) en *Solanum tuberosum* L., *Solanum ulbocastanum* Dun, *Solanum jamesii* Tort, *Solanum chacoense* Bitt, *Solanum microdontum* Bitt. *Solanum etuberosum* Lindl.

(Haberlach *et al.*, 1985) en especies silvestres de *Solanum* y (Gamborg & Wetter, 1975) en *Solanum* sp.

Con las concentraciones (Pectinasa 0,2% + Celulasa 0,2%; Pectinasa 0,3% + Celulasa 0,5%; Pectinasa 0,4% + Celulasa 1%), no se logró obtener una buena recuperación de protoplastos aislados debido a que estas concentraciones no permitieron que se produjera la digestión completa de la lámina media, que une las células entre sí, ni de las paredes de la mayoría de las células; esto fue evidente al observar en el microscopio tejido con células intactas; al respecto investigadores como (Rao & Prakash, 1995) mencionan, a concentraciones enzimáticas óptimas se obtiene un alto rendimiento en protoplastos/ml.

Aun cuando el número de protoplastos obtenidos en el presente estudio es aceptable a lo obtenido en otras especies de *Solanum*, este trabajo constituye el primer reporte de aislamiento de protoplastos para la variedad Unica, demostrando que es viable su uso y su optimización futura en mejoramiento.

CONCLUSIONES

- En la presente investigación se logró obtener el primer reporte para aislamiento de protoplastos de *Solanum tuberosum* variedad única, a partir de plántulas in vitro en la Facultad de Ciencias Agrarias –UNH; con miras a que en un futuro cercano, en nuestra Facultad de Ciencias Agrarias se pueda realizar protocolos de transformación genética tanto para estudios funcionales de genes, así como mejoramiento genético por hibridación somática de la variedad única y otras especies silvestres.
- Los factores que influyeron en el aislamiento, fueron la concentración enzimática y el tiempo de incubación.
- Las concentraciones óptimas para el aislamiento de protoplastos fueron Pectinasa de *Rhizopus* sp. al 1 por ciento y Celulasa de *Aspergillus* sp. al 1,5 por ciento, a las 18 horas; obteniéndose 148500 protoplastos x ml⁻¹.

RECOMENDACIONES

- Debido a que la hibridación interespecífica no tiene barreras de incompatibilidad celular, se recomienda emplear la técnica de aislamiento de protoplastos, seguido de la técnica de cultivo de protoplastos y la fusión de protoplastos para lograr híbridos de especies filogenéticamente distanciadas.
- Se recomienda implementar en la Facultad de Ciencias Agrarias implementar con bioreactores para obtener directamente las enzimas de las bacterias citadas, ya que el costo de las enzimas es relativamente altos.
- Se recomienda utilizar material vegetal *in vitro* para obtener una mayor cantidad de protoplastos ya que es perpetua la condición fisiológica de este material vegetal (juvenil) y de él se puede aislar con mayor eficiencia las células vegetales.
- Las plantas desarrolladas en invernadero deben ser jóvenes, pues en esta etapa de crecimiento del tejido es mucho más fácil una liberación y recuperación de protoplastos.
- Es conveniente controlar el potencial isoosmótico del medio de aislamiento, pues esto evitará que las células se encuentren en un medio hiper o hipotónico, el mismo que dañará por completo el material vegetal.
- Para el aislamiento de protoplastos de *Solanum tuberosum* variedad única, se recomienda utilizar la enzima pectinasa de *Rhizopus* sp. al 1 por ciento más celulasa de *Aspergillus* sp. 1,5 por ciento, debido a que esta solución enzimática optimiza el tiempo de recuperación de protoplastos aislados a partir de hojas, a su vez existe otras enzimas comerciales que también pueden reemplazar a la enzima comercial pectinasa de *Rhizopus* sp.

REFERENCIAS

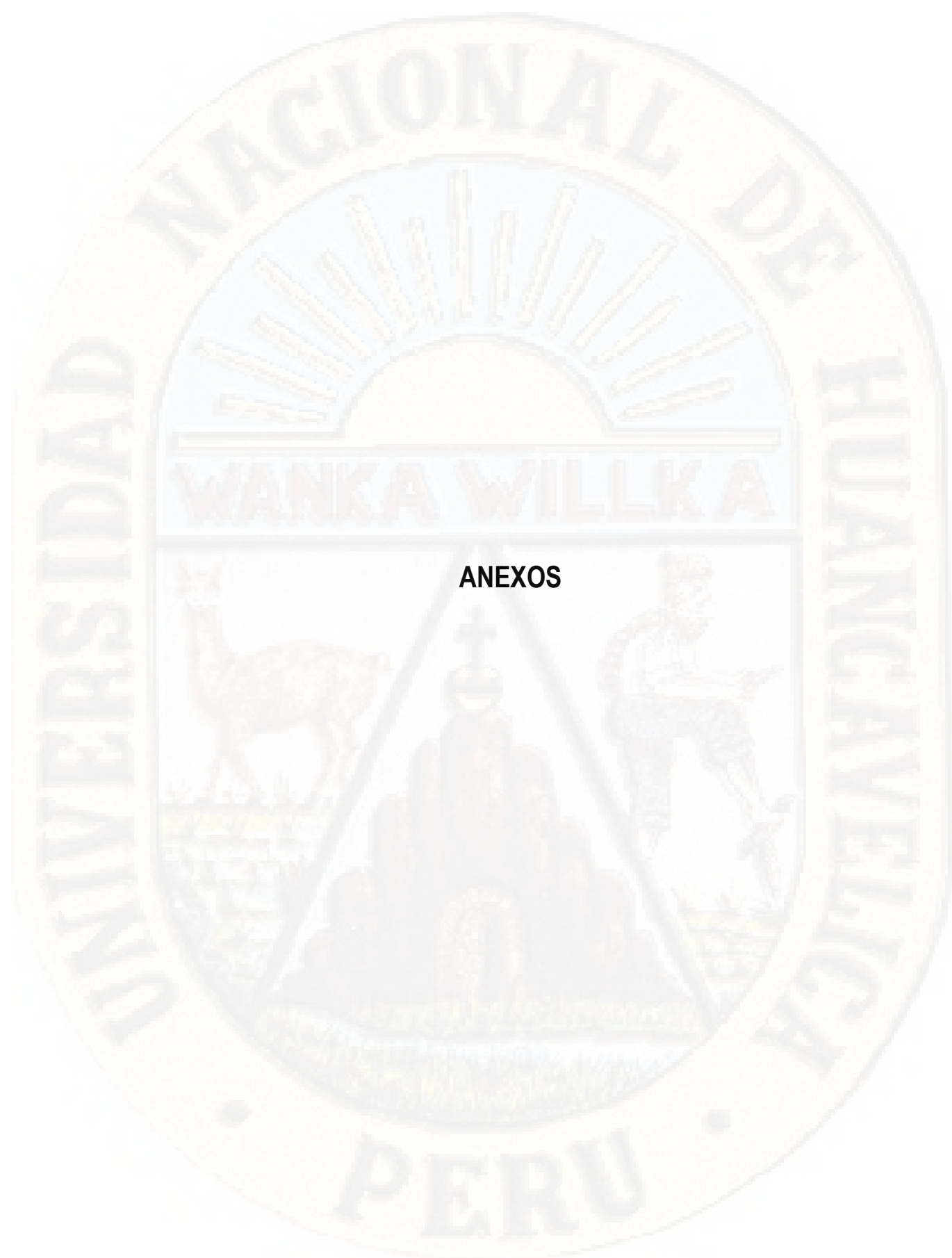
1. ¿Por qué papa? (2008). Retrieved from <http://www.fao.org/potato-2008/en/aboutiyp/index.html>
2. Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., & Voytas, D. F. (2017). Chapter One - Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Challenges. In D. P. Weeks & B. Yang (Eds.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 149, pp. 1–26). Academic Press.
3. Bengochea, T. (2012). *Plant Protoplasts: A Biotechnological Tool for Plant Improvement*. Springer Science & Business Media.
4. Bernal. (2002). *Mitología de la investigación*. Santa Fe de Bogota- Colombia.
5. Brennan, R. M., & Millam, S. (2003). fruits of temperate climates: Improvement and Maintenance of Fruit Germplasm. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 2774–2780). Oxford: Academic Press.
6. Chawla, H. S. (2002). *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publishers.
7. CIAT. (n.d.). Técnicas para el aislamiento y cultivo de protoplastos de yuca. Colombia.
8. CIP. (2018). Catálogo de Clones Red Latinpapa. Retrieved from https://research.cip.cgiar.org/red_varie/pages/brochure.php?variedad=392797.22
9. Cultivar. (2017, October). In *Wikipedia, la enciclopedia libre*. Retrieved from <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Cultivar&oldid=102471543>
10. Cursio. (2002). *Investigación cuantitativa*. Colombia: KINESIS.
11. Dai, C., Mertz, D., & Lambeth, V. (1987). Improved procedures for the isolation and culture of potato protoplasts. *Plant Science*, 50(1), 79–84. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(87\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(87)90033-1)
12. Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts : status and biotechnological perspectives, 23, 131–171. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>
13. Definición de aislamiento. (2018). Retrieved from <https://definicion.de/aislamiento/>
14. Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P., & Ríos, R. (2004). *Biotecnología y*

- Mejoramiento Vegetal*. (V. Echenique, C. Rubinstein, & L. Mroginski, Eds.). Buenos Aires: Ediciones INTA. Retrieved from http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010%0A/09/bio_WEB.pdf
15. Especie. (2018). Retrieved from <http://dle.rae.es/?id=GWfgJDk>
 16. Espejo, R., Cipriani, G., Rosel, G., Golmirzaie, A., & Roca, W. (2013). Híbridos somáticos obtenidos por fusión de protoplastos entre *Solanum tuberosum* L. subsp. *tuberosum* y la especie silvestre *Solanum circaefolium* Bitter. *Revista Peruana de Biología*, 15(1), 73–78. <https://doi.org/10.15381/rpb.v15i1.1678>
 17. Gamborg, O., & Holl, F. B. (1977). Plant Protoplast Fusion and Hybridization. In *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation* (pp. 299–316). Springer, Boston, MA.
 18. Gamborg, O. L., & Wetter, L. R. (1975). *Plant tissue culture methods*. Saskatoon, Sask. : National Research Council of Canada, Prairie Regional Laboratory.
 19. Giles, K. L. (2013). *Plant Protoplasts: International Review of Cytology*. Elsevier.
 20. Haberlach, G. T., Cohen, B. A., Reichert, N. A., Baer, M. A., Towill, L. E., & Helgeson, J. P. (1985). Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related *Solanum* species. *Plant Science*, 39(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90194-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90194-3)
 21. Heldt, H.-W., & Piechulla, B. (2011). 22 - Biotechnology alters plants to meet requirements of agriculture, nutrition and industry. In *Plant Biochemistry (Fourth Edition)* (pp. 551–586). San Diego: Academic Press.
 22. Hernández, E., Rodríguez Benavides, A., Pineda Colorado, R., Valbuena Benavides, R. I., & Estrada Ramos, N. (1996). Variedad de papa para consumo fresco UNIPAPA: ICA-UNICA. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID%0A=CO1999002601>
 23. Hull, R. (2014). Chapter 7 - Replication of Plant Viruses. In *Plant Virology (Fifth Edition)* (pp. 341–421). Boston: Academic Press.
 24. Life, F. O. R. (2006). Enzymes for Cell Dissociation and Lysis, (2).
 25. Mundo de la papa: producción y consumo - Año Internacional de la Papa. (2008). Retrieved from <http://www.fao.org/potato-2008/en/world/>
 26. Nair, K. P. P. (2013). 19 - The Biotechnology of Ginger. In *The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger* (pp. 375–400). Oxford: Elsevier.

27. Papa y biotecnología - Año Internacional de la Papa. (2008). Retrieved from <http://www.fao.org/potato-2008/en/potato/biotechnology.html>
28. Park, J. K., Park, S., & Craven, J. E. (2013). Chapter 13 - Protoplast Isolation and Fusion. In R. H. Smith (Ed.), *Plant Tissue Culture (Third Edition)* (pp. 147–154). San Diego: Academic Press.
29. Potato Biology and Biotechnology. (n.d.). Retrieved from <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Cultures/Potato-Biology-and-Biotechnology.pdf>
30. Power, J. B., & Davey, M. R. (1990). Protoplasts of higher and lower plants : isolation, culture, and fusion. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 6, 237–259. <https://doi.org/10.1385/0-89603-161-6:237>
31. Puite, K. J., Roest, S., & Pijnacker, L. P. (1986). Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Reports*, 5(4), 262–265. <https://doi.org/10.1007/BF00269817>
32. Radke, S., & Grun, P. (1986). Isolation , culture , and regeneration of leaf mesophyll protoplasts of selected clones of *Solanum*, 29(7121), 451–462.
33. Rao, K. S., & Prakash, A. H. (1995). A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Biosciences*, 20(5), 645–655. <https://doi.org/10.1007/BF02703304>
34. Rokka, V. M., Tauriainen, A., Pietilä, L., & Pehu, E. (1998). Interspecific somatic hybrids between potato *Solanum acaule* Bitt. and anther-derived dihaploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Reports*, 18(1–2), 82–88. <https://doi.org/10.1007/s002990050536>
35. Rosales, R. O. G., Espinosa, J. A., & Bonierbale, M. (2007). UNICA: variedad Peruana para mercado fresco y papa frita con tolerancia y resistencia para condiciones climáticas adversas. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 14(1), 41–50.
36. Szczerbakowa, A., Borkowska, M., & Wielgat, B. (2000). Plant regeneration from the protoplasts of *Solanum tuberosum*, *S. nigrum* and *S. bulbocastanum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22(1), 3–10. <https://doi.org/10.1007/s11738-000-0001-x>
37. The importance of Quality potato seed in increasing potato production in Asia and the pacific region. (n.d.). Retrieved from <http://www.fao.org/docrep /010/i0200>

e/I0200E10.htm

38. Thieme, R., Darsow, U., Gavrilenko, T., Dorokhov, D., & Tiemann, H. (1997). Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica*, 97(2), 189–200. <https://doi.org/10.1023/A:1003026125623>
39. Thieme, R., Rakosy-Tican, E., Gavrilenko, T., Antonova, O., Schubert, J., Nachtigall, M., ... Thieme, T. (2008). Novel somatic hybrids (*Solanum tuberosum* L. + *Solanum tarnii*) and their fertile BC1 progenies express extreme resistance to potato virus Y and late blight. *Theoretical and Applied Genetics*, 116(5), 691–700. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0702-2>
40. Zerbini, F. M., Silva, F. N. da, Urquiza, G. P. C., & Basso, M. F. (2014). Chapter 8 - Transgenic Plants. In *Biotechnology and Plant Breeding* (pp. 179–199). San Diego: Academic Press.



ANEXOS

Anexo 1. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a la concentración enzimática a 14 horas.

Rangos			
	CONCENTRACION ENZIMATICA	N	Rango promedio
N° de protoplastos/ml	pec0,2% + cel0,2%	10	5,50
	pec0,3% + cel0,5%	10	15,50
	pec0,4% + cel1%	10	26,45
	pec0,5% + cel1,5%	10	34,55
	Total	40	

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	35,470
gl	3
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: CONCENTRACION ENZIMATICA

Anexo 2. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a la concentración enzimática a 15 horas.

Rangos			
N° de protoplastos/ml	CONCENTRACION ENZIMATICA	N	Rango promedio
	pec0,2% + cel0,2%	10	5,50
	pec0,3% + cel0,5%	10	15,50
	pec0,4% + cel1%	10	26,45
	pec0,5% + cel1,5%	10	34,55
	Total	40	

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	35,814
gl	3
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: CONCENTRACION ENZIMATICA

Anexo 3. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a la concentración enzimática a 16 horas.

Rangos			
	CONCENTRACION ENZIMATICA	N	Rango promedio
N° de protoplastos/ml	pec0,2% + cel0,2%	10	5,50
	pec0,3% + cel0,5%	10	15,50
	pec0,4% + cel1%	10	26,95
	pec0,5% + cel1,5%	10	34,05
	Total	40	

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	35,412
gl	3
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: CONCENTRACION ENZIMATICA

Anexo 4. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a la concentración enzimática a 17 horas.

Rangos			
	CONCENTRACION ENZIMATICA	N	Rango promedio
N° de protoplastos/ml	pec0,2% + cel0,2%	10	5,50
	pec0,3% + cel0,5%	10	15,50
	pec0,4% + cel1%	10	25,50
	pec0,5% + cel1,5%	10	35,50
	Total	40	

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	37,002
gl	3
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: CONCENTRACION ENZIMATICA

Anexo 5. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a la concentración enzimática a 18 horas.

Rangos			
	CONCENTRACION ENZIMATICA	N	Rango promedio
N° de protoplastos /ml	pec0,2% + cel0,2%	10	5,70
	pec0,3% + cel0,5%	10	15,30
	pec0,4% + cel1%	10	25,50
	pec0,5% + cel1,5%	10	35,50
	Total	40	

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	36,580
gl	3
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: CONCENTRACION ENZIMATICA

Anexo 6. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos con respecto al tiempo a pectinasa al 0,2% mas celulasa al 0,2 %.

Rangos			
	TIEMPOS DE INCUBACION	N	Rango promedio
N° de protoplastos/ml	14	10	21,95
	15	10	24,50
	16	10	24,40
	17	10	26,35
	18	10	30,30
	Total	50	

Estadísticos de prueba a,b	
	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	1,840
gl	4
Sig. asintótica	,765

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: TIEMPOS DE INCUBACION

Anexo 7. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos con respecto al tiempo a pectinasa al 0,3% mas celulasa al 0,5 %.

Rangos

	TIEMPOS DE INCUBACION	N	Rango promedio
N° de protoplastos /ml	14	10	17,75
	15	10	20,60
	16	10	26,20
	17	10	31,80
	18	10	31,15
	Total	50	

Estadísticos de prueba ^{a,b}

	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	8,076
gl	4
Sig. asintótica	,089

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: TIEMPOS DE INCUBACION

Anexo 8. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos con respecto al tiempo a pectinasa al 0,4% mas celulasa al 1 %.

Rangos			
	TIEMPOS DE INCUBACION	N	Rango promedio
N° de protoplastos /ml	14	10	8,85
	15	10	15,95
	16	10	24,25
	17	10	34,25
	18	10	44,20
	Total	50	

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	37,988
gl	4
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: TIEMPOS DE INCUBACION

Anexo 9. Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos con respecto al tiempo a pectinasa al 0,5% mas celulasa al 1,5%.

Rangos

	TIEMPOS DE INCUBACION	N	Rango promedio
N° de protoplastos/ml	14	10	6,75
	15	10	15,60
	16	10	24,15
	17	10	35,50
	18	10	45,50
	Total	50	

Estadísticos de prueba ^{a,b}

	N° de protoplastos/ml
Chi-cuadrado	45,783
gl	4
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: TIEMPOS DE INCUBACION

Anexo 10. Comparaciones multiples para enzimas

Variable dependiente: N° de protoplastos

Games-Howell

(I) Enzimas	(J) Enzimas	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
pec0,2 - cel0,2	pec0,3 - cel0,5	-18700,00000*	1071,28570	,000	-21523,2800	-15876,7200
	pec0,4 - cel1	-56900,00000*	1475,06486	,000	-60756,0996	-53043,9004
	pec0,5 - cel1,5	-63500,00000*	1280,74436	,000	-66849,3869	-60150,6131
pec0,3 - cel0,5	pec0,2 - cel0,2	18700,00000*	1071,28570	,000	15876,7200	21523,2800
	pec0,4 - cel1	-38200,00000*	1175,64572	,000	-41302,3556	-35097,6444
	pec0,5 - cel1,5	-44800,00000*	920,12643	,000	-47219,0446	-42380,9554
pec0,4 - cel1	pec0,2 - cel0,2	56900,00000*	1475,06486	,000	53043,9004	60756,0996
	pec0,3 - cel0,5	38200,00000*	1175,64572	,000	35097,6444	41302,3556
	pec0,5 - cel1,5	-6600,00000*	1369,23187	,000	-10183,7677	-3016,2323
pec0,5 - cel1,5	pec0,2 - cel0,2	63500,00000*	1280,74436	,000	60150,6131	66849,3869
	pec0,3 - cel0,5	44800,00000*	920,12643	,000	42380,9554	47219,0446
	pec0,4 - cel1	6600,00000*	1369,23187	,000	3016,2323	10183,7677

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 11. Comparaciones múltiples para tiempo

Variable dependiente: N° de protoplastos

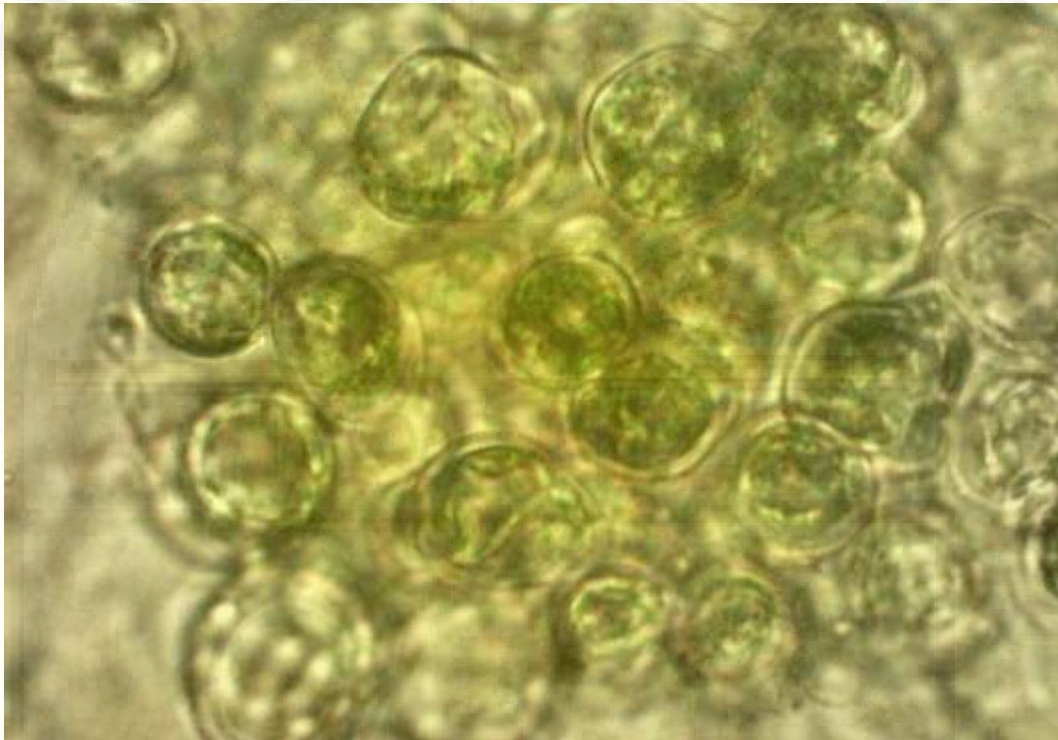
Games-Howell

(I) Tiempos	(J) Tiempos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
14	15	-4625,00000	1875,00000	,120	-9995,3850	745,3850
	16	-8250,00000*	1677,54128	,000	-13083,7840	-3416,2160
	17	-13000,00000*	1536,29339	,000	-17483,1652	-8516,8348
	18	-17000,00000*	1597,18090	,000	-21629,6769	-12370,3231
15	14	4625,00000	1875,00000	,120	-745,3850	9995,3850
	16	-3625,00000	1579,83802	,171	-8165,6391	915,6391
	17	-8375,00000*	1428,96494	,000	-12530,7445	-4219,2555
	18	-12375,00000*	1494,23233	,000	-16692,2502	-8057,7498
16	14	8250,00000*	1677,54128	,000	3416,2160	13083,7840
	15	3625,00000	1579,83802	,171	-915,6391	8165,6391
	17	-4750,00000*	1157,78259	,002	-8083,4074	-1416,5926
	18	-8750,00000*	1237,43687	,000	-12297,9645	-5202,0355
17	14	13000,00000*	1536,29339	,000	8516,8348	17483,1652
	15	8375,00000*	1428,96494	,000	4219,2555	12530,7445
	16	4750,00000*	1157,78259	,002	1416,5926	8083,4074
	18	-4000,00000*	1037,93190	,004	-6976,2117	-1023,7883

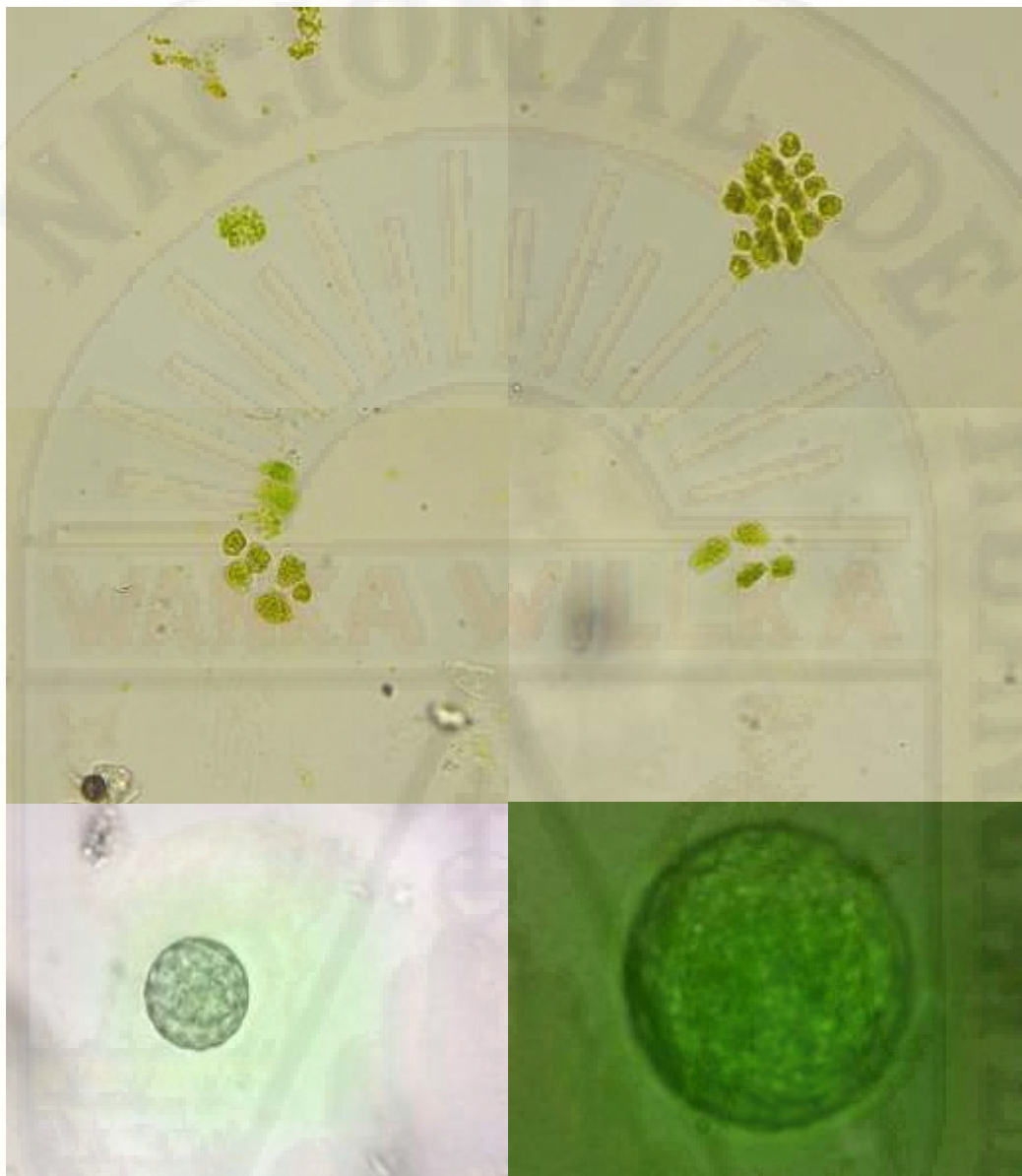
18	14	17000,00000*	1597,18090	,000	12370,3231	21629,6769
	15	12375,00000*	1494,23233	,000	8057,7498	16692,2502
	16	8750,00000*	1237,43687	,000	5202,0355	12297,9645
	17	4000,00000*	1037,93190	,004	1023,7883	6976,2117

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 12. Imágenes obtenidas de protoplastos aislados de *Solanum tuberosum* variedad unica.



Células de *Solanum tuberosum* variedad unica en concentración enzimática (calulasa y pectinasa)



Protoplastos de *Solanum tuberosum* asilados en diferentes concentraciones y diferentes tiempos